

# Der seltsame Fall des Botulinum-Neurotoxins: chemische und biologische Modulierung des tödlichsten aller Gifte

*Bert Willis, Lisa M. Eubanks, Tobin J. Dickerson\* und Kim D. Janda\**

**Stichwörter:**

Bioterrorismus · Botulinum-Neurotoxin ·  
Hochdurchsatz-Screening ·  
Impfstoffentwicklung ·  
Metalloenzyme



In seiner klassischen Erzählung „Der Seltsame Fall des Dr. Jekyll und Mr. Hide“ beschreibt Robert Louis Stevenson einen gespaltenen Menschen zwischen Gut und Böse. Botulinum-Neurotoxin (BoNT), der wirksamste bekannte Giftstoff, ist von ähnlich zwiespältiger Natur: BoNT zeigt einerseits eine ausgeprägte Morbidität und Mortalität, kommt andererseits aber – wenn auch in viel geringeren Dosen – in einem breiten Spektrum klinischer Szenarien zum Einsatz. In jüngerer Zeit sind enorme Fortschritte beim Verständnis der Struktur und Funktion von BoNT erzielt worden, die eine intensive Erforschung von biomakromolekularen und niedermolekularen Modulatoren der BoNT-Aktivität nach sich zogen. Ein Schwerpunkt dieser Projekte lag auf der Identifizierung von Inhibitoren, die einer BoNT-Exposition, z. B. im Falle eines bioterroristischen Anschlags, entgegenwirken können. Dieser Aufsatz fasst die aktuellen Fortschritte bei der Entwicklung von Therapeutika zur Prävention und Behandlung von Botulismus zusammen, mit einem Schwerpunkt auf Impfstoffen sowie peptidischen und niedermolekularen Inhibitoren.

## 1. Einleitung

Botulinum-Neurotoxine (BoNTs) sind mit einer letalen Dosis ( $LD_{50}$ ) von ca. 1 ng pro kg Körpergewicht die stärksten bekannten Giftstoffe.<sup>[1]</sup> Man unterscheidet sieben serologisch verschiedene BoNTs (A–G). BoNT/A, der potenteste Serotyp, ist  $10^6$ -mal toxischer als das Gift der Kobra und  $10^{11}$ -mal toxischer als Cyanid.<sup>[2]</sup> Botulinum-Neurotoxine verursachen die potentiell tödliche Erkrankung Botulismus und werden üblicherweise mit Lebensmittelkontaminationen, Wundinfektionen und kolonisierenden Infektionen bei Säuglingen in Verbindung gebracht. Ein charakteristisches Symptom bei Vergiftungen mit BoNT ist schlaffe Lähmung. Ursache ist eine proteolytische Spaltung spezifischer SNARE-Proteine (SNARE = soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), die für die Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin durch Neuronen wichtig sind. Der Tod tritt durch fortgeschrittene Intoxikation des Kreislaufsystems und letztlich Atemlähmung oder Herzstillstand ein. Die tödliche Wirkung des Toxins beruht daher nicht auf dem direkten Zelltod der betroffenen Zelle, sondern auf sekundären Ereignissen, die von der toxininduzierten Inhibition der Acetylcholinausschüttung im synaptischen Spalt abhängen.

Die erste klinische Dokumentation von Botulismus findet sich in den Arbeiten von Justinus Kerner, einem deutschen Arzt und Dichter,<sup>[3,4]</sup> der für BoNT den Begriff „Wurstgift“ prägte, da Lebensmittelvergiftungen zu jener Zeit oft mit Leber- und Blutwurst in Verbindung gebracht wurden („botulus“ ist das lateinische Wort für Wurst). Kerner's erste Studien deckten sich mit Befunden von Johann Georg Steinbuch, der wie Kerner als Amtsarzt arbeitete. Auf Empfehlung des angesehenen Medizinprofessors Johann Autenrieth begannen Kerner und Steinbuch, auftretende Fälle von Lebensmittelvergiftungen systematisch zu dokumentieren. Die Ergebnisse wurden in der von Autenrieth herausgege-

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8489
2. Molekulare Wirkungsweise von BoNTs und Mechanismus der Neurotransmitterausschüttung	8490
3. Inhibition der BoNT-Intoxikation	8492
4. BoNT/A-Agonismus	8504
5. Zusammenfassung und Ausblick	8505

benen Zeitschrift *Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde* veröffentlicht.<sup>[5,6]</sup> Es war dann Kerner, der in Tier- und auch Selbstversuchen die Studien weiter vorantrieb und der tatsächlich einige therapeutische An-

wendungen für BoNT postulierte.<sup>[4]</sup> Seine Arbeiten brachten ihm den Namen „Wurst-Kerner“ ein. Das Botulismus verursachende Bakterium, *Clostridium botulinum*, wurde aber erst 1897 von dem Mikrobiologen Emile Van Ermengem identifiziert. Dieser isolierte die Bakterien aus einem Schinken, an dessen Verzehr drei belgische Musiker gestorben waren.<sup>[7]</sup>

Die extrem starke und spezifische Wirkung der BoNTs macht das Toxin zu einem sehr potenten Therapeutikum,<sup>[8,9]</sup> das gegen vielfältige Störungen eingesetzt werden kann, z. B. gegen neuromuskuläre Erkrankungen (Strabismus, Blepharospasmen und hemifaziale Spasmen), Hyperhidrose, myofasziale Schmerzen, Migränekopfschmerz und Multiple Sklerose. Die wohl populärste Anwendung findet sich im kosmetischen Bereich mit dem kommerziellen Produkt Botox (das auf BoNT/A basiert), dem eine Antifaltenwirkung zugesprochen wird.

Von BoNTs geht ein ernstzunehmendes Gefahrenpotenzial durch eine mögliche Verwendung als biologische Waffe aus, zumal die Substanzen verhältnismäßig einfach zu beschaffen sind.<sup>[10,11]</sup> Das US-Zentrum für Seuchenkontrolle (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) klassifiziert die BoNTs daher als Substanzen der Kategorie A. Bereits im Zweiten Weltkrieg wurden BoNTs sowohl von den Alliierten als auch den Achsenmächten auf eine mögliche Verwendung als Biowaffe hin geprüft. Von Seiten des irakischen Militärs wurde eingeräumt, dass im Golfkrieg speziell

[\*] Dr. B. Willis, Dr. L. M. Eubanks, Prof. Dr. T. J. Dickerson, Prof. Dr. K. D. Janda  
Departments of Chemistry and Immunology, Skaggs Institute for Chemical Biology, and Worm Institute of Research & Medicine (WIRM), The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 858-784-2595  
E-Mail: tobin@scripps.edu  
kdjanda@scripps.edu

konstruierte Scud-Raketen zum Einsatz kamen, die mit BoNTs präpariert waren. Auch im Kampf gegen den Terror wächst die Sorge vor terroristischen Anschlägen mit BoNTs. Vor diesem Hintergrund wurden große Anstrengungen unternommen, um die Wirkungsweise von BoNTs im Detail aufzuschlüsseln und Wirk- und Impfstoffe zur Prävention und Behandlung von Botulismus zu entwickeln.

Das bislang meiste Interesse bezieht sich auf BoNT/A und BoNT/B, sodass wir auch unsere Diskussion auf diese beiden Serotypen beschränken wollen und dabei einen Schwerpunkt auf BoNT/A legen.

## 2. Molekulare Wirkungsweise von BoNTs und Mechanismus der Neurotransmitterausschüttung

Botulinum-Neurotoxine sind Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 150 kDa, die als einzelne inaktive Polypeptidketten synthetisiert und durch intra- oder extrazelluläre Proteolyse aktiviert werden.<sup>[12]</sup> Die aktive Form des Toxins ist ein durch eine Disulfidbrücke verknüpft Dimer, bestehend aus einer schweren Kette (HC) von 100 kDa und einer Metalloprotease (leichte Kette, LC) von 50 kDa. Die BoNT-Serotypen sind hochgradig homolog, unterscheiden sich aber in ihrer Toxizität und ihrem Wirkort. Wie in Abbildung 1 gezeigt ist, verläuft eine BoNT-Intoxikation in einem mehrstufigen Prozess, an dem jede einzelne funktionelle Domäne des Toxins beteiligt ist. Prinzipiell kann der Verlauf durch vier Phasen beschrieben werden: 1) neurospezifische Bindung an die motorische Endplatte, 2) Internalisierung durch Endozytose, 3) Translokation und Aus-

schüttung der leichten Kette ins Zytosol und 4) Spaltung der SNARE-Proteine und Verhinderung der Vesikelfusion und Acetylcholinausschüttung.<sup>[13,14]</sup>

### 2.1. Zellbindung und Internalisierung

Botulinum-Neurotoxine binden mit ihrer HC-Domäne an cholinerge Nervenenden und werden anschließend durch rezeptorvermittelte Endozytose nach einem Doppelrezeptor-mechanismus internalisiert.<sup>[15]</sup> Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Anlagerung des Toxins an die Zellmembran und das Gangliosid unter Bildung eines niederaffinen Komplexes. Im zweiten Schritt erfolgt die laterale Migration des Komplexes zu einer hochaffinen Proteinbindestelle, wodurch die Endozytose eingeleitet wird. Die Bedeutung der Gangliosidbindung wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen: Inkubation von BoNT/A mit einem Überschuss an Gangliosiden führte zur Detoxifikation des BoNT/A.<sup>[16]</sup> Darüber hinaus waren gangliosidfreie Knockout-Mäuse weniger empfindlich gegen BoNT/A und /B,<sup>[17]</sup> und es konnte gezeigt werden, dass die Bindestelle für BoNT/B und BoNT/G aus nur einem Proteinrezeptor und einem einzelnen Gangliosid besteht.<sup>[18]</sup> Das Zweirezeptormodell wird außerdem durch aktuelle strukturelle Untersuchungen bestätigt,<sup>[19]</sup> in denen die Wechselwirkung von BoNT/B mit Synaptogamin und dem Gangliosid G<sub>T1b</sub> im Detail aufgeklärt wurde.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass der Prozess der rezeptorvermittelten Endozytose von BoNT analog wie die zelluläre Internalisierung anderer Liganden verläuft.<sup>[14]</sup> Allerdings wurde darauf verwiesen, dass eine Rückführungs-



Bert Willis studierte Chemie an der Georgia Southern University (B.S. 1999) und promovierte 2005 an der Clemson University unter der Anleitung von Dev P. Arya mit einer Arbeit zur biophysikalischen Analyse von Aminoglycosid-Konjugaten und deren Rolle in der Nucleinsäureerkennung. Seit 2005 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von K. D. Janda. Seine Forschungsinteressen gelten Impfstoffen gegen Nikotinsucht, der Entwicklung von Adjuvantien und niedermolekularen Inhibitoren von K<sup>+</sup>-Kanälen.



Tobin J. Dickerson studierte Chemie an der University of Virginia (B.S. 1999) und promovierte 2004 am Scripps Research Institute. 2005 erhielt er einen Ruf als Juniorprofessor an das dortige Institut für Chemie und das Worm Institute for Research and Medicine (WIRM). Seine Forschungsinteressen umfassen die chemische Reaktivität von Missbrauchsdrogen, das Zusammenspiel kleiner Moleküle mit dem Immunsystem, Ansätze für die Behandlung von Filariose und Techniken zur Modulation der BoNT-Toxizität.

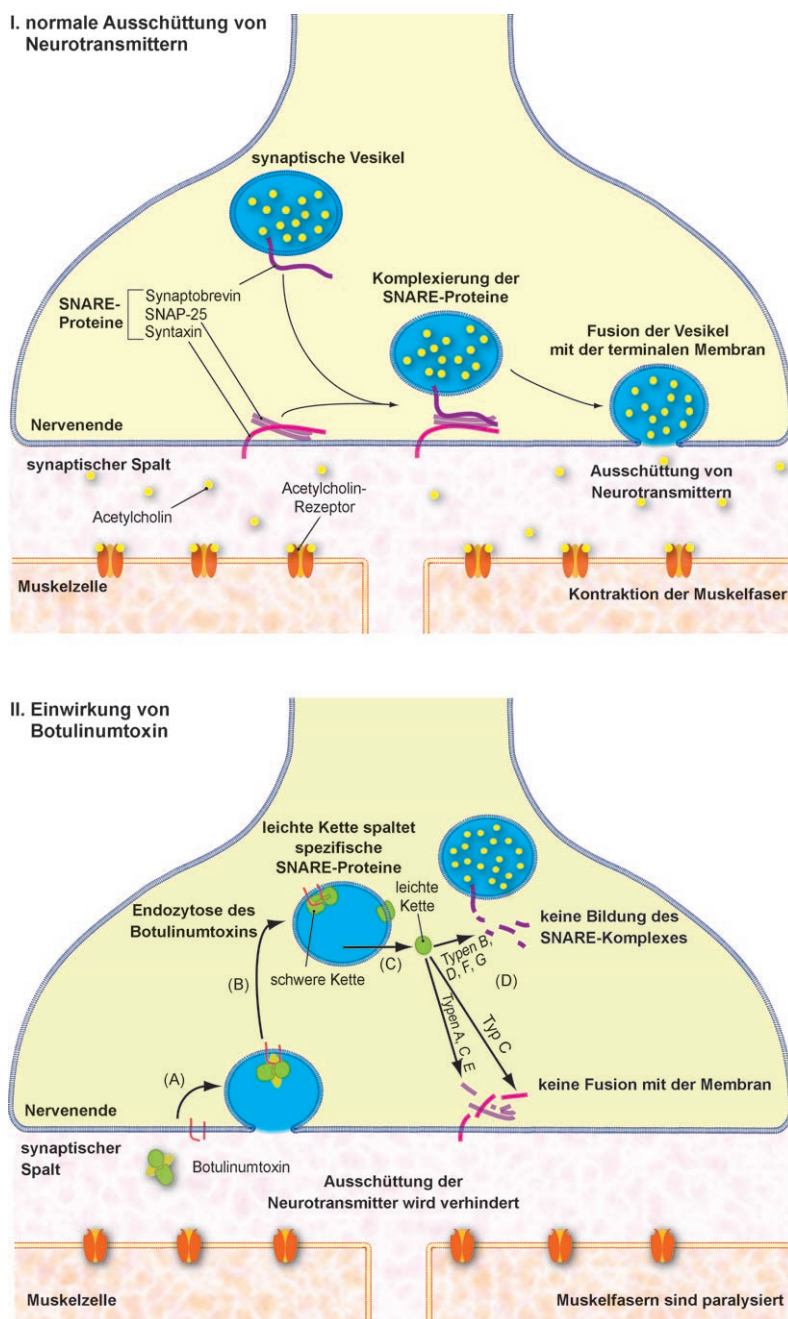


Lisa M. Eubanks studierte Chemie mit Nebenfach Biologie am Huntingdon College und promovierte 2002 an der University of Utah unter der Anleitung von C. Dale Poulter mit einer Arbeit über Enzyme des Isoprenoidstoffwechsels. Ab 2003 war sie NIH-Postdoc in der Arbeitsgruppe von Kim D. Janda am Scripps Research Institute, wo sie 2007 zum Staff Scientist befördert wurde. Ihre Forschungsinteressen gelten der Entwicklung von BoNT-Intoxikationen und von Methoden für die Diagnose von Onchozerkose.



Kim D. Janda studierte klinische Chemie an der University of South Florida (B.S. 1980) und promovierte 1984 in organischer Chemie an der University of Arizona. Er ist Professor am Scripps Research Institute in den Instituten für Chemie und Immunologie. Er ist außerdem Skaggs-Stipendiat, hält den Ely R. Callaway-Lehrstuhl in Chemie und ist Direktor des Worm Institute for Research and Medicine (WIRM). Zu seinen Auszeichnungen gehören der Alfred P. Sloan Fellow Award (1993) und der Arthur Cope Scholar Award (1999). Er ist Mitbegründer der Firmen CombiChem und Drug Abuse Sciences.





**Abbildung 1.** Wirkungsweise der Botulinum-Neurotoxine. I) Normale Neurotransmitterausschüttung. II) Die einzelnen Phasen der BoNT-Intoxikation: A) Bindung des Neurotoxins an zelluläre Oberflächenrezeptoren; B) Endozytose in eine intrazelluläre Vesikel; C) durch die HC-Domäne vermittelte Translokation der LC-Domäne ins Zytosol; D) proteolytische Spaltung spezifischer SNARE-Proteine. BoNT/B, /D, /F und /G spalten Synaptobrevin, BoNT/A, /C und /E spalten SNAP25, BoNT/C spaltet außerdem Syntaxin.

phase innerhalb des Vesikelzyklierungsmechanismus ebenfalls ein plausibler Eintrittsweg sein könnte.<sup>[20]</sup> Hintergrund ist die Tatsache, dass exozytierende Nerven einen effektiven und gut entwickelten Mechanismus zur Membranrückgewinnung besitzen.<sup>[21]</sup> Im Fall von BoNT wurde gefunden, dass die Endozytose durch Rezyklierung sekretorischer Vesikel vermittelt wird. Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass BoNT/A und /B in ähnlicher Weise an synaptische

Protein-Vesikel-Komplexe binden und Wechselwirkungen zu Komplexen wie SV2, Synaptotagmin I, Synaptophysin und VAMP2 sowie zu vakuolären Protonenpumpen ausbilden.<sup>[22]</sup> Synaptotagmin II, ein Proteinrezeptor für BoNT/B, weist eine in das Vesikellumen exponierte Domäne auf, was auf eine mögliche Beteiligung von Vesikeln am Eintrittsmechanismus schließen lässt. Eine Exozytose könnte Synaptotagmin für kurze Zeit außerhalb der Nervenzelle befördern, währenddessen BoNT an einen oder mehrere Rezeptoren bindet, sodass während der Rezyklierungsphase das Synaptotagmin zusammen mit dem Toxin internalisiert würde. Um diese Theorie zu untermauern, wurden markierte Derivate von Synaptotagmin-Antikörpern verwendet, um die Membranrückgewinnung und die Neubildung intraneuronaler Vesikel zu verfolgen.<sup>[23]</sup> In einem anderen Ansatz wurde kürzlich das synaptische Vesikelprotein SV2 anhand struktureller Untersuchungen als möglicher Rezeptor für BoNT/A vorgeschlagen, was eine allgemeine Beteiligung der Vesikelrezyklierung am Zelleintritt der Botulinum-Neurotoxine vermuten lässt.<sup>[24,25]</sup>

## 2.2. Translokation

Da sich die Substrate der BoNTs im Zytosol der Zelle befinden, muss die LC-Protease zunächst das Endosom verlassen, bevor eine Spaltung der SNARE-Proteine möglich ist. Es wurde vorgeschlagen, dass BoNTs innerhalb dieser acidischen Kompartimente eine pH-abhängige strukturelle Umordnung durchlaufen<sup>[26]</sup> und so für den Eintritt ins Zytosol vorbereitet werden. Der Prozess tritt auch in bestimmten Bakterien auf. Allgemein geht man davon aus, dass die Translokation durch die Exposition vergrabener endosomaler Domänen bei sinkendem pH-Wert angetrieben wird.<sup>[14]</sup> Die auf diese Weise exponierten Domänen ermöglichen eine Durchdringung der Lipiddoppelschicht und führen somit zur Translokation der leichten Kette (LC) ins Zytosol. Der Mechanismus wurde durch die Behandlung motorischer Endplatten mit der niedermolekularen Verbindung Chloroquin untersucht, die effektiv und spezifisch den endosomalen pH-Wert erhöht.<sup>[27]</sup> Dieser Ansatz zur Hemmung der Toxinentlassung aus dem Endosom ist die erste nicht-peptidische Methode für einen BoNT-Antagonismus.

Die Vorstellung, dass BoNTs in einem pH-induzierten Translokationsprozess internalisiert werden, ist inzwischen allgemein akzeptiert, wenngleich der genaue Mechanismus der Membrandurchdringung ungeklärt geblieben ist. Um den Prozess genauer zu erforschen, wurden die Widerstands-

änderungen künstlicher Membranen in Abhängigkeit von der Toxinlokalisation bestimmt.<sup>[28]</sup> Eine Annahme war, dass die schwere Kette sowohl als Kanal als auch als Chaperon fungieren kann, und es wurde nachgewiesen, dass BoNT/A und /E unter Bedingungen, wie man sie ähnlich *in vivo* vermutet, Ionenkanäle in Phospholipid-Doppelschichten und PC12-Zellmembranen bilden.<sup>[29]</sup> Eine Leitfähigkeitsuntersuchung an Einzelmolekülen zur Klärung der BoNT-Dynamik wies getrennte Zwischenstufen der Translokation nach, die durch drei Hauptzustände charakterisiert sind:<sup>[30]</sup> 1) ein geschlossener Zustand, in dem der BoNT-Kanal geschlossen ist; 2) ein verdeckter Zustand, in dem die teilgefaltete LC-Domäne innerhalb des Kanals eingeschlossen ist; 3) ein unverdeckter Zustand, der von einer Entlassung der leichten Kette begleitet ist. Für BoNT/E konnte nachgewiesen werden, dass, anders als bei BoNT/A, eine trypsinaktivierte proteolytische Abspaltung der LC-Domäne vom HC-Chaperon während des verdeckten Zustands zwingend notwendig für die Translokation ist.<sup>[30]</sup> Mit ähnlichen Techniken wurde die Rolle der Disulfidbrücke zur Aufrechterhaltung der Strukturintegrität während der Translokation bewiesen. Hier zeigte sich, dass eine vorzeitige Reduktion der Disulfidbrücke oder der Austausch des Disulfids durch eine Amidbindung die Translokation negativ beeinträchtigt.<sup>[31]</sup> Es folgt daraus, dass die Abspaltung von der HC-Domäne erst nach der vollständigen Translokation der LC erfolgt.

### 2.3. Katalyse durch die leichte Kette und Spaltung von SNARE-Proteinen

SNARE-Proteine sind Schlüsselkomponenten bei der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran. Die Spaltung von SNARE-Proteinen durch BoNT hemmt die Ausschüttung von Acetylcholin an der motorischen Endplatte, was zu einem Verlust der Neurotransmission führt.<sup>[13,14]</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass die Spaltung einzelner SNARE-Proteine nicht die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert, sondern zu einem nichtfunktionalen Komplex führt, in dem die Kopplung zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustrom und der Fusion unterbrochen ist.<sup>[32]</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  spielt im Prozess der BoNT-abhängigen Hemmung der Neurotransmitterausschüttung eine fundamentale Rolle. So wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Synapse teilweise zu einer Umkehr der BoNT/A-Wirkung führt.<sup>[33]</sup>

Die leichten Ketten der BoNTs sind zinkabhängige Metalloproteasen, die innerhalb eines hoch konservierten, 20 Aminosäuren langen Segments das verbreitete Zinkbindemotiv His-Glu-Xaa-Xaa-His enthalten.<sup>[34]</sup> Jeder BoNT-Serotyp spaltet eins der drei SNARE-Proteine [Synaptobrevin (vesikelassoziertes Membranprotein, VAMP), SNAP25 (synaptosomales Protein mit 25 kDa) und Syntaxin], die unentbehrlich für Vesikelfusion und Acetylcholinausschüttung sind. VAMP fungiert als Substrat für BoNT/B, /D, /F und /G, und SNAP25 fungiert als Substrat für BoNT/A und /E. Der Serotyp C spaltet sowohl SNAP25 als auch Syntaxin.

Die Domänenerkennung durch die BoNT/A-LC (LC/A) und die anschließende Spaltung von SNAP25 sind in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Wie in Abbildung 2

dargestellt ist, verläuft dieser mehrstufige Prozess über eine Reihe von Bindungsereignissen zwischen der LC-Domäne und SNAP25.<sup>[35–37]</sup> Diese Interaktionen bewirken sowohl eine exakte Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum als auch Konformationsänderungen, die letztlich zur Spaltung von SNAP25 führen. Der mehrstufige Mechanismus der LC/E-Erkennung konnte auf ähnliche Weise kürzlich ebenfalls aufgeklärt werden.<sup>[36]</sup> Als Endresultat dieser Untersuchungen hat man nun ein klares Bild von der Art und Weise, wie LC-Domänen von BoNTs SNARE-Proteine spezifisch erkennen und spalten, sodass auf lange Sicht die erfolgreiche Entwicklung potenter LC-Inhibitoren zu erwarten ist.

## 3. Inhibition der BoNT-Intoxikation

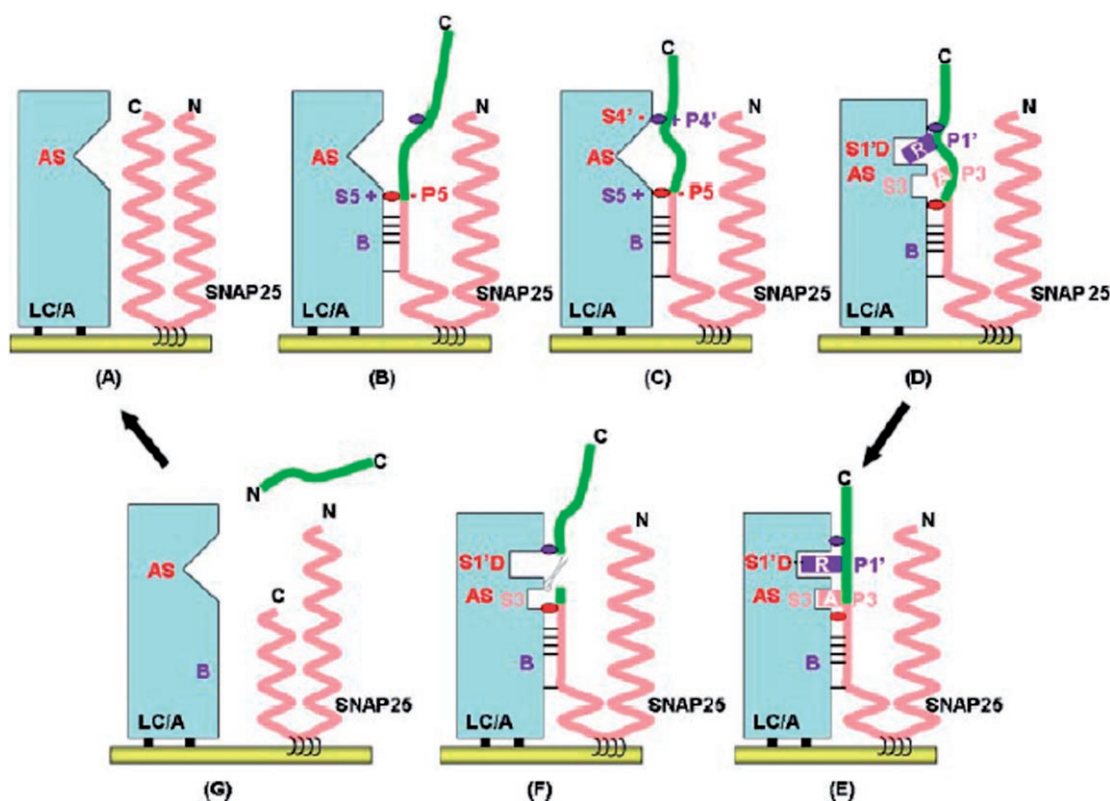
Zahlreiche akademische und industrielle Forschungsprojekte weltweit sind mit der Suche nach neuen Ansätzen zur Prävention oder Behandlung von Botulismus befasst. Zwei Arten von Schutzmaßnahmen zur Bekämpfung von BoNT-Intoxikationen sind zurzeit akzeptiert: Präexpositionsprophylaxe durch Impfstoffe oder postexpositorische Gegenmaßnahmen durch BoNT-Antikörper enthaltende Seren.

Auf der Grundlage von Röntgenstrukturdaten der Botulinum-Neurotoxine wurden beim rationalen Design peptidbasierter Substratmimetika und niedermolekularer Inhibitoren der LC-Domäne beträchtliche Erfolge erzielt. Beide Ansätze zielen auf eine inhibitorische Regulation der durch BoNT-Exposition hervorgerufenen Effekte ab. Drei Stufen im molekularen Mechanismus der Zellintoxikation wurden als mögliche therapeutische Targets identifiziert: 1) die Bindung des Toxins an zelluläre Oberflächenrezeptoren, 2) die Translokation der LC-Domäne ins Zytosol und 3) die katalytische Spaltung eines der drei SNARE-Proteine. Die erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 3.1. Antagonisten der Toxin-Rezeptor-Bindung

#### 3.1.1. Aktive Impfstoffe

Derzeit vertreiben das US-amerikanische CDC und das US-Verteidigungsministerium einen pentavalenten (ABCDE) Botulinumtoxoid-Impfstoff als präventive Maßnahme gegen Botulismus. Obwohl Park Davis & Co. bereits in den 50er Jahren mit der Entwicklung, Herstellung und klinischen Testung dieses Impfstoffs begonnen hatten,<sup>[38]</sup> wird er von Seiten des CDC nach wie vor als experimenteller Wirkstoff (Investigational New Drug, ING) klassifiziert. Er enthält auf Aluminiumphosphat adsorbierte, mit Formalin inaktivierte Botulinum-Toxine (Serotypen A, B, C, D und E), denen Thimerosal und Formaldehyd als Konservierungsstoffe zugesetzt sind. Die Immunisierung verlangt eine tiefe subkutane Injektion von 0.5 mL des Impfstoffs, auf die drei weitere Injektionen nach 2, 12 und 24 Wochen sowie jährliche Auffrischungen ab dem zwölften Monat folgen. Nach Abschluss der ersten Impfsérie sowie der ersten Auffrischung nach einem Jahr wiesen praktisch alle Probanden für mindestens 360 Tage erhebliche Mengen an Antitoxin mit zum Schutz hinreichenden Antikörpertitern auf.<sup>[39–41]</sup>



**Abbildung 2.** Mehrstufiger Prozess der Erkennung und Spaltung von SNAP25 durch LC/A: A,B) Membranständige Wechselwirkungen zwischen den Belt-Regionen der LC-Domäne und der B-Region von SNAP25; dieses Bindungsereignis ordnet P<sub>5</sub> (Asp<sup>193</sup>) so an, dass eine Salzbrücke mit P<sub>3</sub> (Arg<sup>177</sup>) gebildet wird. C) Ausrichtung der C-terminalen Kette zur Ausbildung der P<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>-Wechselwirkung (Lys<sup>201</sup> mit Asp<sup>257</sup>). D) Verbreiterung des aktiven Zentrums (AS), wodurch eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen P<sub>3</sub> und S<sub>3</sub> vermittelt wird, die P<sub>1</sub> (Arg<sup>198</sup>) in ausreichende räumliche Nähe für die elektrostatische Bindung mit S<sub>1</sub> (Asp<sup>370</sup>) bringt. E) Anordnung der Regionen P<sub>1</sub> und P<sub>3</sub> im aktiven Zn<sup>2+</sup>-Motiv. F) Substratspaltung. G) Nach der Spaltung und Entlassung des C-terminalen Produkts kehrt das aktive Zentrum in seine ursprüngliche Konformation zurück. Wiedergabe mit Genehmigung der ASBMB.<sup>[37]</sup>

Trotzdem dieses pentavalente Toxoid seit rund 50 Jahren zur Immunisierung tausender Menschen eingesetzt worden ist, gibt es eine ganze Reihe von Problemen hinsichtlich seiner Verfügbarkeit und Herstellung. So ist der Impfstoff nicht der Öffentlichkeit zugänglich und wird ausschließlich expositiongefährdetem Militärpersonal und Forschungsmitarbeitern mit direktem Toxinumgang verabreicht. Die Impfstoffproduktion ist wegen des hohen Kostenaufwands und der Notwendigkeit staatlich regulierter Anlagen ausgesprochen schwierig. Die strengen Sicherheitsvorkehrungen sind verständlich in Anbetracht der generellen Risiken, die mit der Kultivierung tödlicher sporenbildender Bakterien wie *Clostridium botulinum* und der Handhabung großer Mengen des extrem gefährlichen Toxins verbunden sind. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde in einer neueren Studie die mögliche Verwendung einer nichtkatalytischen rekombinanten Form des Toxins als Impfstoffkandidat geprüft.<sup>[42]</sup> Zwei einzelne Punktmutationen innerhalb der LC-Domäne inaktivierten BoNT/A und verhinderten die Spaltung des Zielproteins. Am wichtigsten war aber der Befund, dass das mutierte Toxin (BoNT/A<sup>RYM</sup>) die für die Wirksamkeit eines Impfstoffs notwendige Immunogenität beibehielt. Mäuse, die mit 1.0 µg BoNT/A<sup>RYM</sup> in einem Aluminiumhydroxidadjuvans immunisiert worden waren, überlebten anschließende Expositionen mit der 10000-fachen LD<sub>50</sub> von BoNT/A. Diese

neuen Ergebnisse lassen vermuten, dass rekombinante, katalytisch inaktive Botulinumtoxine in Zukunft als brauchbare Impfstoffe dienen könnten.

Die meisten der aktuellen Forschungsprojekte konzentrieren sich auf die Entwicklung eines breiter zugänglichen, billigeren und insgesamt sichereren Botulismus-Impfstoffs. Ende der 80er Jahre wurde in Studien mit rekombinanten Fragmenten des Tetanustoxins nachgewiesen, dass die ca. 50 kDa schwere, C-terminale Rezeptorbindedomäne des Toxins ein gutes Immunogen ist, das in Mäusen die Produktion neutralisierender Antikörper induzierte.<sup>[43]</sup> Da Tetanus- und Botulinumtoxine einen hohen Grad an Sequenz- und Strukturhomologie aufweisen,<sup>[43–47]</sup> wurde eine ähnliche Strategie zur Entwicklung der nächsten Impfstoffgeneration gegen Botulismus verfolgt.

Große nichttoxische synthetische Gene, die für die Rezeptorbindedomäne von BoNT/A (BoNT/A-HC) codieren, wurden sowohl in *Escherichia coli*<sup>[48,49]</sup> als auch in *Pichia pastoris*<sup>[50,51]</sup> exprimiert und im Tierexperiment auf ihre Wirkung gegen Botulismus untersucht. Erste Studien von Middlebrook und Mitarbeitern belegten, dass zwei Impfungen mit einem Rohextrakt von BoNT/A-HC in Mäusen einen partiellen Schutz bei Expositionen mit dem bis zu 1200-fachen der LD<sub>50</sub> von BoNT/A boten.<sup>[48]</sup> In einer nachfolgenden Studie testeten Smith und Mitarbeiter die Wirksamkeit



von in Hefe produzierten, auf 95 % Homogenität aufgereinigten BoNT/A-HC-Proteinen.<sup>[51]</sup> Der ED<sub>50</sub>-Wert dieser Fragmente wurde zu ca. 0.1 µg pro Maus bestimmt. (Der ED<sub>50</sub> ist die Dosis, bei der bei 50 % der Testtiere der gewünschte Effekt auftritt.) Die Tiere erhielten 1–3 Injektionen mit Dosen von 0.01 µg bis 2.0 µg und wurden 21 Tage nach der letzten Injektion der 100 000-fachen intraperitonealen LD<sub>50</sub> von BoNT/A ausgesetzt. Insgesamt überlebten 98 % der geimpften Mäuse mit einem Antikörpertiter von  $\geq 1600$ . Von den Tieren mit einem Serumtiter von  $\leq 100$  überlebten nur 14 %, womit eine Korrelation zwischen der Überlebensrate und den Antikörpertitern im Serum nachgewiesen war.<sup>[51]</sup> Aufbauend auf diesen Befunden sind auch die HC-Fragmente der Serotypen A–F untersucht worden.<sup>[41,52–57]</sup>

Die potenzielle Leistungsfähigkeit rekombinanter Impfstoffe wurde kürzlich am Primatenmodell mit aerosolischer Exposition bestätigt.<sup>[58]</sup> Das Modell ist von außerordentlicher Relevanz, da eine Verteilung des Toxins über die Luft als die wahrscheinlichste Form eines bioterroristischen Anschlags eingeschätzt wird. Im Experiment wurde nachgewiesen, dass die Impfung von Rhesusaffen mit rekombinantem BoNT/B-HC gegen aerosolische Exposition mit der 50-fachen Rhesusaffen-LCT<sub>50</sub> von BoNT/B schützt. Zudem konnten noch nach bis zu 2 Jahren messbare Titer in immunisierten Tieren festgestellt werden.

Drei weitere Strategien, die ebenfalls an der HC ansetzen, wurden verfolgt: 1) Impfstoffe auf Basis des Replikonvektorsystem des VEE-Virus (Erreger der Venezuelanischen Pferdeenzephalitis),<sup>[59]</sup> 2) Impfstoffe auf DNA-Basis<sup>[60]</sup> und 3) Impfstoffe auf Basis von Adenoviren.<sup>[61]</sup> Im ersten Fall wurde die BoNT/A-HC-Domäne des Neurotoxins in einem VRP-Impfstoff (VRP = VEE-Replikonpartikel) verwendet, das die Expression der BoNT/A-HC-Domäne in vivo ermöglicht und damit eine Immunantwort gegen das Protein auslöst.<sup>[62]</sup> Nach subkutaner Inokulation mit dem Impfstoff waren Mäuse gegen Exposition mit der 100 000-fachen intraperitonealen LD<sub>50</sub> von BoNT/A geschützt. Hinsichtlich der zweiten Strategie untersuchten mehrere Forschergruppen Impfstoffe auf Basis einer Plasmid-DNA, die für ein Fusionsprotein codiert, das aus der BoNT-HC-Domäne und einer Igκ-Signalsequenz besteht.<sup>[63,64]</sup> Ebenfalls untersucht wurden für die BoNT/A-HC-Domäne codierende DNA-Vehikel, für die eine MHC-I- oder MHC-II-Prozessierung vorhergesagt wurde.<sup>[65]</sup> Die dritte Strategie zielt auf die Entwicklung eines rekombinanten adenoviralen Impfstoffs auf Basis der BoNT/C-HC.<sup>[61]</sup> Eine einzelne Dosis des Impfstoffs war in der Lage, eine robuste, lang anhaltende Immunantwort gegen BoNT/C auszulösen. Insgesamt waren alle drei Arten von Impfstoffen im Tiermodell wirksam und können daher als aussichtsreiche Kandidaten für einen BoNT-Impfstoff betrachtet werden.

### 3.1.2. Passive Impfstoffe

Die passive Verabreichung von Antikörpern zur Abwehr biologischer Substanzen wurde als potenzielle Therapie gegen Pathogene wie Anthrax, BoNT, Pest und Pocken erforscht.<sup>[66]</sup> Die gegenwärtige Hauptbehandlungsmethode bei humanem adultem Botulismus ist die Verabreichung equiner Antitoxine (polyklonale Antikörper) in Verbindung mit un-

terstützender Therapie. Das CDC vertreibt zwei equine Antitoxine zur Behandlung von BoNT/A, /B und /E. Im Allgemeinen sind die Antitoxine am wirksamsten, wenn sie innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Erkrankung verabreicht werden.<sup>[67]</sup> Unglücklicherweise kann das equine Serum Nebenwirkungen wie Serumkrankheit und Anaphylaxie hervorrufen und zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen.<sup>[68]</sup>

Säuglingsbotulismus wird mit einer passiven Antikörpertherapie mit Derivaten humaner Immunglobuline behandelt.<sup>[69]</sup> Das humane intravenöse Immunglobulin (BIG-IV) wird vom CDC zur Behandlung von Botulismus der Typen A und B vertrieben. Es wurde gezeigt, dass BIG-IV bei umgehender Anwendung sicher und effektiv die Schwere der Erkrankung lindert.<sup>[69]</sup> Ein Problem der Methode ist die begrenzte Verfügbarkeit humaner Immunglobulinderivate von immunisierten Spendern.

Polyklonale Antiseren enthalten hunderte bis tausende verschiedener Antikörper, die an vielfältige Epitope binden. Immunisiert man Menschen oder Tiere mit ungiftigen Formen eines bestimmten Antigens, so kann anschließend ein polyklonales Antiserum gegen das betreffende Immunogen isoliert werden. Allerdings ist die Gewinnung polyklonaler Antikörper mit einigen Nachteilen verbunden (z.B. eine je nach Charge schwankende Qualität,<sup>[70]</sup> die begrenzte Versorgungslage<sup>[71]</sup> oder die mögliche Übertragung ansteckender Infektionskrankheiten<sup>[72]</sup>). Monoklonale Antikörper (mAbs) können dagegen mit hoher Qualität in großen Mengen produziert werden und weisen keinerlei Infektionsrisiko auf. Darüber hinaus ist es möglich, nichthumane mAbs in eine humanisierte, weniger immunogene Form umzuwandeln, deren Sequenz zu ca. 90 % von humanen Immunglobulinen abgeleitet ist.<sup>[73]</sup>

Monoklonale Antikörper gegen BoNT könnten sich als ein wertvolles therapeutisches Mittel für die Bekämpfung von Botulinum-Intoxikationen herausstellen.<sup>[74]</sup> Neutralisierende mAbs sind besonders wirksam, wenn sie als Präexpositionsprophylaktikum verabreicht werden, um die Bindung des Toxins an Zellrezeptoren und somit dessen Aufnahme in Neuronen zu verhindern. Bei postexpositorischer Gabe dürften sie deutlich weniger wirksam sein, vor allem wegen des schmalen Verabreichungszeitfensters. Ähnlich wie die Antitoxine können neutralisierende Antikörper nur frei zirkulierende BoNTs abfangen und werden nutzlos, sobald das Toxin vollständig endozytiert ist.<sup>[67]</sup> Zwei Techniken zur Isolierung monoklonaler Antikörper gegen einige der BoNT-Serotypen wurden bisher verwendet: 1) die Immunisierung von Mäusen mit einem Toxoid oder der HC-Domäne von BoNT, gefolgt von üblichen Hybridoma-Techniken<sup>[75–78]</sup> und 2) die Selektion monoklonaler Antikörper gegen BoNTs oder Toxinfragmente mittels Phagen-Display.<sup>[79–81]</sup>

Der Großteil der Forschungen über monoklonale Antikörper gegen BoNTs galt bisher dem Serotyp A. Bislang wurde kein mAb gegen BoNT/A gefunden, der einzeln verabreicht eine ausreichende Neutralisationswirkung hätte. So neutralisieren einzelne mAbs nur maximal das 10- bis 100-fache der LD<sub>50</sub> von BoNT/A,<sup>[77,82]</sup> wogegen ein Cocktail aus drei mAbs die 450 000-fache LD<sub>50</sub> von BoNT/A neutralisiert.<sup>[83]</sup> Mit diesem Befund kann angenommen werden, dass

wirkungsvolle antikörperbasierte Therapien zur Prävention und Behandlung von Botulinum-Intoxikationen mehrere synergistisch wirksame monoklonale Antikörper benötigen werden.

### 3.1.3. Niedermolekulare Antagonisten der Rezeptorbindung

Zwei Ansätze zur Inhibierung von Toxin-Zell-Wechselwirkungen sind denkbar: 1) die Bindung von BoNT durch einen niedermolekularen Liganden, um die Interaktion des Toxins mit zellulären Rezeptoren zu verhindern, und 2) die Bindung des zellulären Rezeptors durch einen niedermolekularen Liganden, um die Interaktion mit dem Toxin zu verhindern. Für ersteren Ansatz wurden polysialylierte Ganglioside wie  $G_{T1b}$  als mögliche BoNT/A-Liganden untersucht.<sup>[84,85]</sup> Freies  $G_{T1b}$  blockierte die Bindung von BoNT/A an Synaptosomen<sup>[16]</sup> und löschte die Tryptophanfluoreszenz von BoNT/A.<sup>[86]</sup> In einer neueren Studie wurde nachgewiesen, dass synthetische  $G_{T1b}$ -basierte Glycokonjugate durch Bindung der BoNT/A-HC-Domäne die Spaltung von SNAP25 in Rückenmarkszellen aus Rattenembryonen verhindern.<sup>[87]</sup>

Beim zweiten Ansatz wurden niedermolekulare BoNT-Kompetitoren um die zelluläre Bindungsstelle untersucht, unter anderem pflanzliche und tierische Lectine (aus *Triticum vulgare* bzw. *Limax flavus*). In BoNT/A-Experimenten an hemidiaphragmatischen Nervus-Phrenicus-Präparaten aus Mäusen waren die Lectine in der Lage, die Zeit bis zum Einsetzen der neuromuskulären Lähmung von 78 min auf 128 min zu verlängern. Bemerkenswert an dieser Studie war, dass für die Serotypen B–F und Tetanustoxin ähnliche Ergebnisse erzielt wurden,<sup>[88]</sup> womit erstmals ein für alle Serotypen universeller niedermolekularer BoNT-Antagonist beschrieben wurde.

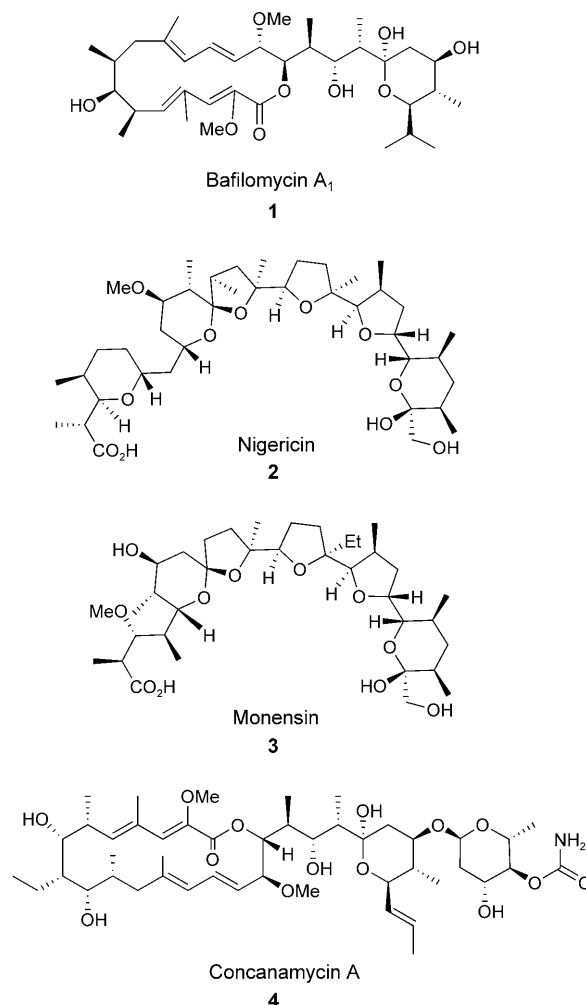
### 3.2. Antagonisten der pH-abhängigen BoNT-Translokation

Die Letalität von BoNT beruht auf der Unterdrückung der synaptischen Transmission an den motorischen Endplatten von Skelettmuskeln. Allen BoNT-Serotypen ist gemeinsam, dass das Holotoxin in ein endozytotisches Vesikel verpackt und anschließend acidifiziert wird. Diese Acidifizierung ist eine Voraussetzung für das Auftreten des BoNT-induzierten Muskelversagens. Es wurde gefunden, dass die Acidifizierung hemmende Substanzen den Ausbruch einer motorischen Lähmung *in vitro* verzögern und das Toxin anfälliger für seine Neutralisierung durch Antiseren machen.<sup>[27]</sup> Damit ist die Acidifizierung endozytotischer Vesikel ein vielversprechender Ansatz für die Inhibierung der BoNT-Aktivität.

Zum Beispiel wirken Ammoniumchlorid und Methylaminhydrochlorid als konzentrations- und zeitabhängige Antagonisten der neuromuskulären Lähmung durch BoNT/A, /B, /C und Tetanustoxin.<sup>[89]</sup> Eine Schutzwirkung konnte aber nur dann beobachtet werden, wenn die Substanzen entweder vor oder binnen 10–20 min nach der Toxinexposition zugesetzt wurden. Bemerkenswerterweise verursachten die Amine in antagonistisch wirksamen Konzentrationen weder eine Inaktivierung des Toxins noch irreversible Ver-

änderungen der Gewebefunktion, weshalb angenommen wurde, dass sie einzig der Toxin-Internalisierung entgegenwirken.

Die Acidifizierung endozytotischer Vesikel benötigt eine vesikuläre  $H^+$ -ATPase, die Protonen aus dem Zytoplasma ins Vesikellumen befördert. Im Jahr 1994 beschrieb Simpson den ATPase-Inhibitor Bafilomycin A1 (**1**, Schema 1) als Univer-



**Schema 1.** Antagonisten der BoNT-Translokation.

salantagonisten von BoNT A–G und Tetanustoxin.<sup>[90]</sup> Bafilomycin A1 verursachte eine konzentrationsabhängige Blockade der neuromuskulären Transmission ohne dabei die Nerven- oder Muskelaktivität zu stören. Protonen-Ionophore sind ebenfalls in der Lage, den pH-Gradienten ohne Beeinflussung der ATP-Hydrolyse abzuschwächen. Zum Beispiel erhöhen die beiden Polyether-Antibiotika Nigericin (**2**) und Monensin (**3**, Schema 1) als Ionophore die Membranpermeabilität der Kationen  $H^+$ ,  $Na^+$  und  $K^+$  und neutralisieren somit durch Kurzschluss des Protonenflusses die für die endosomale Acidifizierung notwendigen pH-Gradienten.<sup>[91]</sup> Während die Ionophore in nanomolaren Konzentrationen eine Blockade der BoNT-Aktivität zeigten, führte eine höhere Konzentration zur Umkehr des Effekts. Concanamy-



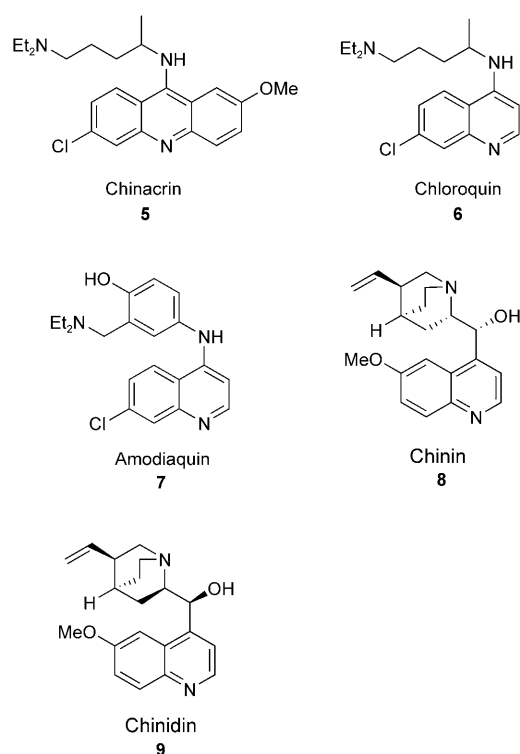
ein A (4, Schema 1), ein weiterer  $H^+$ -ATPase-Inhibitor, wurde kürzlich auf eine Inhibierung der endosomalen Acidifizierung untersucht.<sup>[92]</sup> Concamycin A verhinderte die Spaltung von SNAP25 in vorbehandelten und in 15 min nach Toxin-Exposition behandelten Neuronen in Kultur. Eine Zugabe nach erst 40 min blieb ohne Schutzwirkung.

Malariamedikamente, z.B. Aminochinolone (Schema 2), wurden ebenfalls darauf getestet, BoNT/A-induzierte neuromuskuläre Lähmung zu hemmen.<sup>[93]</sup> Als antagonistischer Mechanismus wurde zunächst eine Unterdrückung der endosomalen Acidifizierung angenommen, es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass der Antagonismus durch ein Blockieren der für die Freisetzung der LC-Domäne benötigten Kanäle zustande kommt. Adler und Mitarbeiter testeten Mepacrin und den Metallchelatlignier TPEN (*N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethyldiamin) in einer „Kombinationstherapie“ und fanden eine um 100 % erhöhte Schutzwirkung gegen BoNT-assoziierte Letalität verglichen mit den einzelnen Liganden.<sup>[94]</sup>

### 3.3. Inhibition der BoNT-Metalloprotease (LC)

Wie bereits beschrieben wurde, stören Botulinum-Toxine die neuronale Exozytose durch spezifische Proteolyse von SNARE-Proteinen, deren Assemblierung nach einhelliger Meinung eng mit der Membranfusion und Neurotransmitterausschüttung verbunden ist.<sup>[95]</sup> Da die Hydrolyse der SNARE-Proteine von hochspezifischen BoNT-LC-Domänen katalysiert wird, liefert eine Inhibierung der Metalloprotease-Aktivität einen weiteren Ansatzpunkt für die therapeutische Inaktivierung von BoNT. Die Suche nach Inhibitoren der BoNT-Protease konzentrierte sich hauptsächlich auf Peptide, Peptidmimetika und niedermolekulare Inhibitoren der LC-Domänen von BoNT/A und /B (LC/A und LC/B).

Das gemeinsame Motiv der Schlüsselproteine VAMP, SNAP25 und Syntaxin ist eine neun Aminosäuren lange Region, die, an unterschiedlichen Positionen entlang der  $\alpha$ -Helix, eine Kombination ähnlicher chemischer Eigenschaften aufweist.<sup>[96]</sup> Um die Rolle dieser konservierten Segmente aufzuschlüsseln, wurde ein Satz von Peptiden synthetisiert, die den konservierten Segmenten aus VAMP, SNAP25 und Syntaxin entsprechen (Abbildung 3).<sup>[96]</sup> Die Analyse des Peptidsatzes ergab, dass V2, ein synthetisches VAMP-Peptid, und S1, ein synthetisches SNAP25-Peptid, die Spaltung aller drei SNARE-Substrate (VAMP, SNAP25 und Syntaxin) hemmen. Beide Peptide (V2 und S1) hatten keinerlei Effekt auf die Neuroexozytose, verhinderten aber in kultivierten Neuronen aus *Aplysia californica* die Neurotransmitterblockierung. Auf der Grundlage dieser

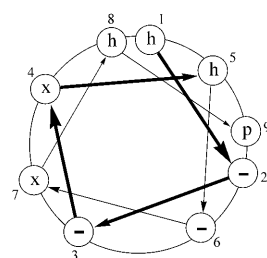


**Schema 2.** Aminochinolin-Antagonisten BoNT/A-induzierter neuromuskulärer Lähmung.

Befunde wurde gemutmaß, dass Botulinumtoxine eine doppelte Interaktion mit ihren Proteinsubstraten benötigen, nämlich eine konservierte Strukturerkennungsregion und eine substrat- und damit serotypspezifische Spaltungsregion.<sup>[96]</sup>

	x	h	(-)	(-)	x	h	(-)	x	h	p
V1	<sup>38</sup> Q	V	D	E	V	V	D	I	M	R <sup>47</sup>
V2	<sup>62</sup> E	L	D	D	R	A	D	A	L	Q <sup>71</sup>
S1	<sup>21</sup> L	A	D	E	S	L	E	S	T	R <sup>31</sup>
S2	<sup>35</sup> L	V	E	E	S	K	D	A	G	I <sup>45</sup>
S3	<sup>49</sup> M	L	D	E	Q	G	E	Q	L	E <sup>59</sup>
S4	<sup>145</sup> E	M	D	E	N	L	E	Q	V	S <sup>155</sup>
x1	<sup>29</sup> F	M	D	E	F	F	E	Q	V	E <sup>38</sup>
x1	<sup>164</sup> E	L	E	D	M	L	E	S	G	N <sup>173</sup>

**Abbildung 3.** Oben: Konservierte Segmente von VAMP, SNAP25 und Syntaxin sowie ihre gemeinsamen chemischen Eigenschaften, angezeigt durch die allgemeine Formel [x h – – x h – x h p]; „x“ steht für eine beliebige Aminosäure, „–“ für ein Carboxylat, „h“ für eine hydrophobe Seitenkette und „p“ für eine polare Gruppe. V1 und V2 sind synthetische VAMP-Peptide, S1–S4 sind SNAP25-Peptide, x1 und x2 sind Syntaxin-Peptide. Unten: Axiale Projektion des konservierten Motivs. Wiedergabe mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.<sup>[96]</sup>



## 3.3.1. Peptidmimetika der leichten Kette von BoNT/A

Eine kleine Sammlung von Peptiden der allgemeinen Struktur Ac-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-Linker-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> wurde auf der Grundlage allgemeiner Strukturmerkmale von SNARE-Komplexen entwickelt, wobei als X<sub>n</sub>-Monomere Asp, Glu, Gln oder Arg variiert wurden und als Linker 4-Aminobuttersäure zur Verwendung kam.<sup>[97]</sup> Der Linker wurde gewählt, um die Rückgratkonformation des Peptids dahingehend zu verändern, dass eine verbesserte BoNT-Erkennung erzielt wird. In Folgestudien wurde das Repertoire der X<sub>n</sub>-Aminosäuren auf zwölf erweitert (was zu 12<sup>4</sup> möglichen Peptiden führt)<sup>[98]</sup> und mithilfe der kombinatorischen PS-SCL-Technik (PS-SCL = positional scanning synthetic combinatorial library) auf das optimale Peptid durchmustert.

Insgesamt ergaben diese Studien, dass die meisten potenten LC/A-Inhibitoren nach den allgemeinen Formeln Ac-X<sub>1</sub>M<sub>2</sub>-Linker-X<sub>3</sub>C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> und C<sub>1</sub>-Linker-X<sub>2</sub>S<sub>3</sub> aufgebaut waren, die eine 75-prozentige Inhibierung erreichten. LC/B-Inhibierungen von über 80 % wurden mit Peptiden vom Typ Ac-X<sub>1</sub>C<sub>2</sub>-Linker-X<sub>3</sub>C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> und C<sub>1</sub>-Linker-X<sub>2</sub>F<sub>3</sub> erzielt.<sup>[99]</sup>

Vor einigen Jahren erkannten Schmidt und Mitarbeiter, dass die spezifischen Eigenschaften der Metalloprotease-domäne (LC) zur Entwicklung von BoNT/A-Inhibitoren genutzt werden können.<sup>[100]</sup> Da Sulfhydrylgruppen Zink leicht komplexieren, wurde gefolgert, dass die Substitution von Schlüsselaminosäuren durch Cys zu Molekülen führen könnte, die die Enzymaktivität von BoNTs hemmen. Ein weiterer Hinweis war der Befund, dass thiolhaltige Liganden wie Dithiothreitol und sogar einzelne Cysteinmonomere die LC/A hemmen können, wenn auch nur in hohen Konzentrationen (> 10 mM).

In den Studien wurde die SNAP25-Region 194–200 (gekennzeichnet als P<sub>4</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>1'</sub>, P<sub>2'</sub>, P<sub>3'</sub>) eines 17 Aminosäuren langen Substrats N<sup>ac</sup>-Acetyl-SNKTRIDEANQ-RATKML-Carboxamid variiert; fettgedruckte Seitenketten wurden jeweils einzeln durch Cys ersetzt (Tabelle 1). Interessanterweise hydrolysierte LC/A die an den Positionen P<sub>4</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>2'</sub> und P<sub>3'</sub> Cys-substituierten Substrate, wobei als wichtigste Beobachtung keine Abhängigkeit zwischen der Bindungsaffinität und der Hydrolysegeschwindigkeit zu verzeichnen war. Beispielsweise zeigten endständig Cys-substi-

tuerte Peptide (P<sub>4</sub> oder P<sub>3'</sub>) geringere K<sub>m</sub>-Werte als die SNAP25-Originalsequenz, aber vergleichbare k<sub>cat</sub>-Werte. Eine inverse Abhängigkeit wurde beobachtet, wenn Ala-Seitenketten in größerer Nähe zur Schnittstelle ersetzt wurden (P<sub>3</sub> oder P<sub>2'</sub>). Die Autoren schlossen hieraus, dass die Diskriminierung von Substraten an den komplementären Bindungsstellen während des Katalyseschritts geschehen muss.<sup>[100]</sup>

Des Weiteren konnte eine Reihe von LC/A-Inhibitoren mit Cys-Substitutionen in den Position P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> und P<sub>1'</sub> identifiziert werden (Tabelle 1). In allen Fällen – außer bei Arg – führte ein Austausch in Position P<sub>1'</sub> zu einer deutlichen Affinitätssteigerung verglichen mit nativem SNAP25. Generell resultierten Cys-Substitutionen in P<sub>2</sub> und P<sub>1</sub> in einem guten Inhibitionsvermögen, wogegen der Austausch von Arg in P<sub>1'</sub> ein sowohl hydrolytisch als auch inhibitorisch inaktives Peptid ergab. Die Ergebnisse belegen, dass die Arg-Seitenkette an Position P<sub>1'</sub> entscheidend ist, um ein starkes Bindungsvermögen zu gewährleisten. Interessanterweise führte der Austausch mit D-Cys (Q11b-C) in P<sub>1</sub> zur stärksten gemessenen Inhibierung.<sup>[100]</sup> Im weiteren Verlauf der Studien wurden Peptide mit deutlicher Inhibitorwirkung gekürzt, sodass an P<sub>2</sub> beginnende Octapeptide entstanden. Substitutionen in den Positionen P<sub>2</sub> und P<sub>1</sub> wurden ebenfalls vorgenommen, um die Relevanz der Cysteinposition in dieser Region zu beurteilen. Wie aus Tabelle 2 klar ersichtlich ist, weisen kürzere Peptide

**Tabelle 2:** Verkürzte Peptidinhibitoren mit variablem Cysteingehalt in der Region P<sub>2</sub> bis P<sub>1'</sub>.

Peptid	Sequenz								K <sub>i</sub> [μM]
	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1'</sub>	P <sub>2'</sub>					
1	C	Q	R	A	T	K	M	L	190
2	D-C	Q	R	A	T	K	M	L	140
3		C	R	A	T	K	M	L	1.9
4		D-C	R	A	T	K	M	L	1.8
5	N	C	R	A	T	K	M	L	500
6	A	C	R	A	T	K	M	L	150
7	N	D-C	R	A	T	K	M	L	150
8	A	D-C	R	A	T	K	M	L	26
9	C	D-C	R	A	T	K	M	L	110
10		C	D-R	A	T	K	M	L	410

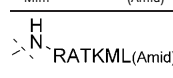
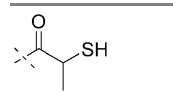
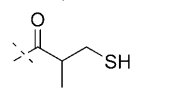
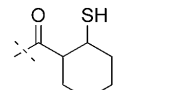
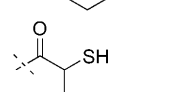
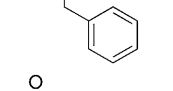
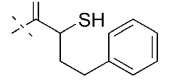
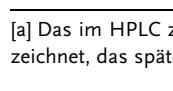
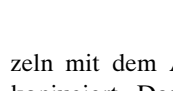
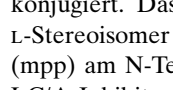
**Tabelle 1:** Durch Substitution mit Cystein hergestellte Substratanaloga in der Region P<sub>4</sub> bis P<sub>3'</sub> eines 17 Aminosäuren langen SNAP25-Mimetikums.

Peptid	Teilsequenz						
	P <sub>4</sub> 8	P <sub>3</sub> 9	P <sub>2</sub> 10	P <sub>1</sub> 11	P <sub>1'</sub> 12	P <sub>2'</sub> 13	P <sub>3'</sub> 14
SNAP	E	A	N	Q	R	A	T
E8C	C	A	N	Q	R	A	T
A9C	E	C	N	Q	R	A	T
N10C	E	A	C	Q	R	A	T
N10D-C	E	A	D-C	Q	R	A	T
Q11C	E	A	N	C	R	A	T
Q11D-C	E	A	N	D-C	R	A	T
R12C	E	A	N	Q	C	A	T
A13C	E	A	N	Q	R	C	T
T14C	E	A	N	Q	R	A	C

eine deutlich höhere Affinität zu BoNT/A auf als das native SNAP25-Substrat. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse konnten schließlich zwei unverzichtbare Strukturbedingungen für die Entwicklung peptidischer LC/A-Inhibitoren formuliert werden: 1) eine Thiolgruppe an Position P<sub>1</sub> zur Bindung des Zinks im aktiven Zentrum und 2) eine Arg-Seitenkette an Position P<sub>1'</sub> für eine starke Substratbindung.<sup>[100]</sup>

Eine zweite Generation peptidmimetischer LC/A-Inhibitoren basierte auf Cys-Analoga an Position P<sub>1</sub>,<sup>[101]</sup> wobei zwei Entwicklungsstrategien verfolgt wurden: 1) Substitution der α-Aminogruppe mit diversen anderen Funktionalitäten unter Erhaltung der Thiolgruppe am β-Kohlenstoff; 2) Modifikation des β-Kohlenstoffs mit anderen funktionellen Gruppen unter Verschiebung der Thiolgruppe nach Cα (Tabelle 3). Nach Synthese der Monomere wurde jedes Mimetikum ein-

**Tabelle 3:** N-terminale Strukturen von Cysteinmimetika der Sequenz C-MimRATKML<sub>(Amid)</sub><sup>[a]</sup>

	Stereoisomer	K <sub>i</sub> [μM]
	<b>10a</b>	1
	<b>10b</b>	30
	<b>11a</b>	50
	<b>11b</b>	20
	<b>12a</b>	70
	<b>12b</b>	100
	<b>13a</b>	8
	<b>13b</b>	0.3
	<b>14a + 14b</b>	2

[a] Das im HPLC zuerst eluierende Stereoisomer wird jeweils mit **a** bezeichnet, das später eluierende mit **b**.

zeln mit dem Aminoterminus des Hexapeptids RATKML konjugiert. Das wirksamste Peptidmimetikum enthielt das L-Stereoisomer der 2-Mercapto-3-phenylpropionylgruppe (mpp) am N-Terminus (Verbindung **13b**). Dies ist der erste LC/A-Inhibitor mit einem K<sub>i</sub>-Wert im nanomolaren Bereich (kompetitive Inhibition, K<sub>i</sub> = 330 ± 50 nM).

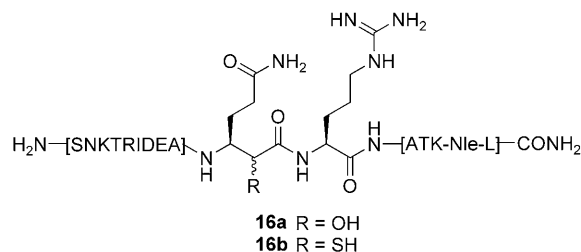
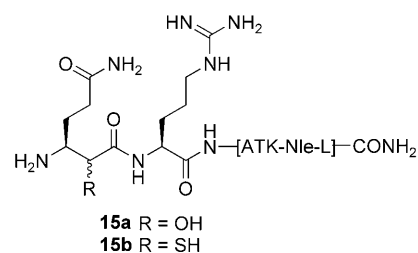
In weitergehenden Studien mit **13b** wurde die Aminosäurezusammensetzung variiert und die zentrale Hexamerregion verkürzt oder verlängert. Hierbei wurde nachgewiesen, dass das Peptid mpp-RATKM die minimalen Strukturvoraussetzungen für hohe Bindungsaffinität erfüllt (Tabelle 4). Bei genauerer Betrachtung von Tabelle 4 erschließt sich

**Tabelle 4:** Der Effekt verlängerter und verkürzter Varianten von C-MimRATKML<sub>(Amid)</sub> auf den K<sub>i</sub>-Wert.

Inhibitor	K <sub>i</sub> [μM]	Inhibitor	K <sub>i</sub> [μM]
mpp-R	60	mpp-RATKMLGSG	0.3
mpp-RA	60	mpp-RATKAL	0.7
mpp-RAT	30	mpp-RATA <sup>+</sup> ML	3
mpp-RATK	4	mpp-RAA <sup>+</sup> KML	0.7
mpp-RATKM	0.3	mpp-RV <sup>+</sup> TKML	2
mpp-RATKML	0.3	mpp-K <sup>+</sup> ATKML	> 300

die Wichtigkeit der Arg-Seitenkette an Position P<sub>1</sub>. Dies ist in Einklang mit früheren Studien, in denen die Spezifität der Inhibitor/Substrat-Enzym-Wechselwirkung der Arg-Seitenkette zugeschrieben wurde.<sup>[100]</sup> Es muss aber angemerkt werden, dass nach aktuellen Erkenntnissen zum Katalysemechanismus der BoNT/A von viel komplexeren Strukturansforderungen für eine potente Inhibition auszugehen ist.<sup>[35–37]</sup>

Mit dem Ziel, die Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes von BoNT-Metalloproteasen aufzuklären, entwickelten Rich und Mitarbeiter isosterische Di- und Tripeptide, die aus Übergangszustandsanaloge der Schnittstellen für sowohl LC/A als auch LC/B bestanden.<sup>[102,103]</sup> Die Hydroxyethylen- oder Thioethylen-Analoga wurden in längere Peptide eingefügt, die den zu beiden Serotypen passenden Substraten entsprachen.<sup>[104,105]</sup> Im Fall von BoNT/A wurden die modifizierten Peptide in ein 17-meres Peptidanalogen der SNAP25-Region 187–203 (**16a** und **16b**, Schema 3)<sup>[104]</sup> sowie in ein kürzeres, 7-meres Peptid eingebaut (**15a** und **15b**).<sup>[101]</sup> Die Peptide zeigten eine deutliche Inhibition (K<sub>i</sub> = 200–400 nM) mit einer geringen Korrelation zwischen Länge und inhibitorischer Aktivität, sodass auch stark gekürzte Peptide für die Inhibition von LC/A verwendet werden können. Dies ist in Einklang mit den Studien von Schmidt et al. (**13b**, BoNT/A K<sub>i</sub> = 330 nM).<sup>[101]</sup>



**Schema 3.** Peptidmimetika von SNAP25, die eine isostere α-Hydroxy- oder α-Thioethylengruppe an der Spaltungsstelle tragen. Die Mimetika mit α-Thioethylengruppe zeigen die stärksten inhibitorischen Aktivitäten gegen BoNT/A-Metalloprotease (K<sub>i</sub> < μM).

### 3.3.2. Peptidmimetika der leichten Kette von BoNT/B

Erste Studien der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von LC/B-Inhibitoren wurden von Roques et al. mit einer Kombination aus Molecular Modeling und Strukturdaten vorgenommen.<sup>[106]</sup> Als Inhibitoren wurden β-Aminothiolderivate untersucht, deren Inhibitorwirkung gegen das Tetanustoxin – einen strukturellen Verwandten von BoNT/B mit identischer VAMP-Spaltungsstelle – gut dokumentiert ist.<sup>[107,108]</sup> Es wurden zwei Pseudopeptid-Bibliotheken angelegt, die jeweils durchmustert wurden, um die Erkennung der S<sub>1</sub>- und S<sub>2</sub>-Subregionen zu optimieren.<sup>[106]</sup> Durch Testen einiger Seitenketten an Position P<sub>1</sub> fand man, dass eine Phenylgruppe mit einem Carboxylat an Position 4 eine optimale Erkennung ermöglicht.

Bezüglich der Optimierung der P<sub>1</sub>-Seitenkette nahm man an, dass sterisch anspruchsvolle aromatische Liganden güns-



tig sind, weil die  $S_1$ -Subregion von LC/B und Holo-BoNT/B laut Kristallstrukturanalysen tief und hydrophob ist<sup>[109,110]</sup> und zudem das native LC/B-Substrat einen Phenylalaninrest enthält. Die Optimierung der  $S_2$ -Erkennung ergab eine Präferenz für eine bicyclische heteroaromatische Seitenkette. Interessanterweise ist diese Position im nativen VAMP durch Glu besetzt, sodass die natürliche Erkennung dieser Subregion nicht ideal ist. Dies könnte erklären, weshalb die katalytische Aktivität von Modifikationen an dieser Position unabhängig ist. Das aus den Untersuchungen hervorgehende Pseudopeptid **17** (Schema 4) war deutlich aktiver in der LC/B-Inhibierung als alle anderen damals bekannten Peptide ( $K_i = 20$  nM).<sup>[106]</sup> Weitere Optimierungen ergaben Liganden mit geringfügig höherer Aktivität als **17**, z. B. die Verbindung **18**, die eine Methylengruppe weniger enthält (Schema 4).<sup>[111]</sup> Erstaunlicherweise zeigte Verbindung **19**, ein eng verwandtes Disulfid-Derivat von **17**, eine um bis zu zehnfach verbesserte Inhibierung von LC/B.<sup>[111]</sup>

In weiteren Versuchen zur Optimierung der LC/B-Inhibierung wurden ein  $\alpha$ -Hydroxyamid- oder ein  $\alpha$ -Thioamidrest an der Gln-Phe-Verknüpfung in 35-mere VAMP-Analoga

eingebaut. Es resultierte eine moderate Inhibierung ( $K_i$  im niedrigen  $\mu$ M-Bereich), die rund 25 % schwächer war als mit den Tripeptidderivaten. Ein klarer Nachteil dieser Strukturen ist die zusätzliche substituierte Methylengruppe an der Modifizierungsstelle, die die Erkennung des Rückgrats durch LC/B erschwert.<sup>[106]</sup>

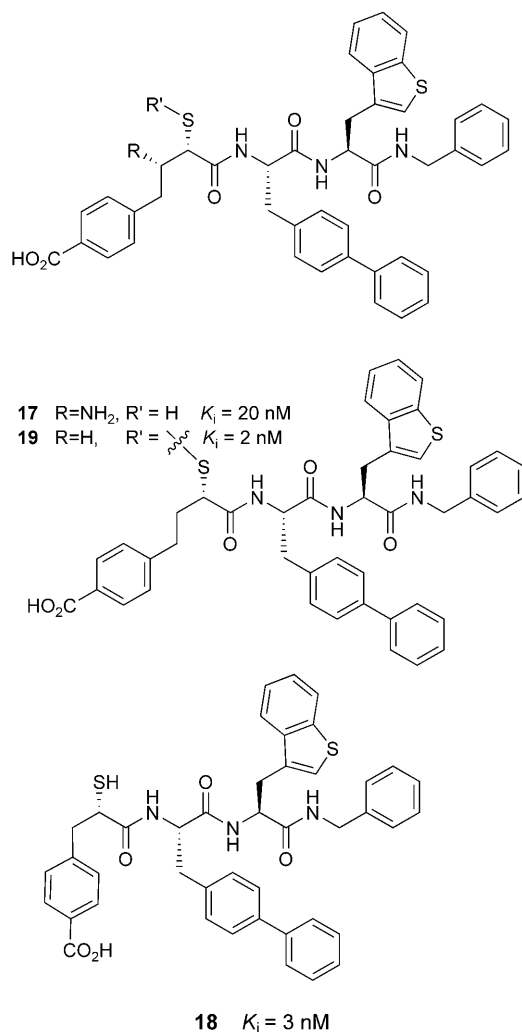
### 3.3.3. Biochemische Techniken

Phagen-Display wurde genutzt, um Peptide für die Inhibierung multipler BoNT-Serotypen zu erzeugen.<sup>[112,113]</sup> Drei Peptide wurden identifiziert, die in vitro als Inhibitoren der Proteaseaktivität wirken,<sup>[113]</sup> allerdings konnte lediglich eine moderate Bindung der Peptide an LC/A, /B und /E nachgewiesen werden (vollständige Inhibierung bei 250  $\mu$ M). Trotz der eingeschränkten Aktivitäten belegt dieses Beispiel, dass Phagen-Display zur Identifizierung von Leitpeptiden verwendet werden kann, die anschließend weiter optimiert werden und Einblicke in die Wirkungsweise des Toxins geben können. In einer neueren Studie wurde Phagen-Display von VAMP-Varianten eingesetzt, um die für die Bindung und Katalyse relevanten Substraterkennungsdomänen in LC/B zu bestimmen.<sup>[112]</sup>

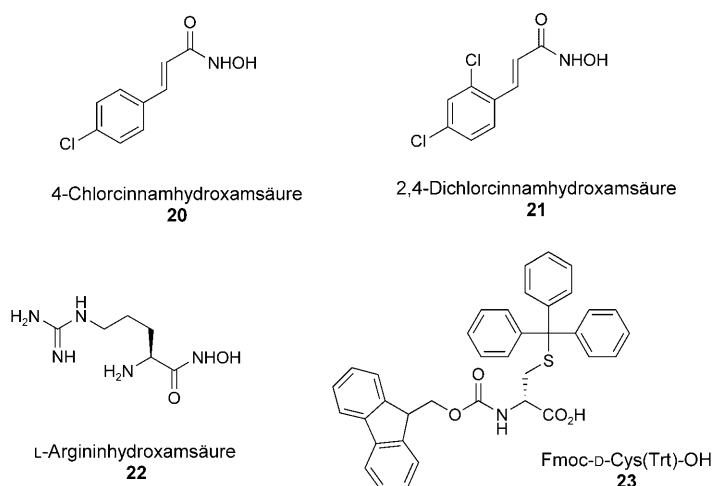
Eine weitere Technik, die zur Identifizierung von LC/A-Inhibitoren eingesetzt wurde, ist mRNA-Display.<sup>[114]</sup> Hierbei wurde eine Sequenz CRATKML, die dem C-Terminus von SNAP25 entspricht, konstant gehalten und mit vier randomisierten Aminosäuren konjugiert, sodass eine Bibliothek von 160 000 Sequenzen des Typs MXXXXCRATKML resultierte (X steht für eine zufällige Aminosäure). Nach drei Screeningrunden konnten einige Inhibitoren identifiziert werden, wobei vor allem das Übermaß an unpolaren Seitenketten innerhalb der Sequenz überraschte. Das Peptid MWMTSCRATKML war einer der aktivsten Inhibitoren mit  $K_i$ -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich und war damit deutlich aktiver als die durch Phagen-Display identifizierten Peptide ( $K_i < 1$  mM). Dies belegt, dass mRNA-Display ein wirkungsvoller Ansatz zur Entdeckung neuer Peptide zur BoNT-Erkennung ist.<sup>[114]</sup>

### 3.3.4. Chelatliganden für $Zn^{2+}$

Ein aktueller Ansatz zur Identifizierung neuer niedermolekularer LC/A-Inhibitoren beruhte auf einem Hochdurchsatz-FRET-Assay (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer). In der Validierungsphase des Assays wurde die einzelne modifizierte Aminosäure L-Arg-Hydroxamsäure (**22**, Schema 5) als moderater LC/A-Inhibitor ( $K_i = 60$   $\mu$ M) identifiziert.<sup>[115]</sup> Angesichts der nativen Spaltungsstelle zwischen den Seitenketten Gln197 und Arg198 von SNAP25 war eine Inhibierung durch ein Arg-Derivat zwar nicht ganz unerwartet, interessant war aber, dass die D- und L-Isomere eine ähnliche Inhibierung zeigten. Es wurde vorgeschlagen, dass die stereochemische Konfiguration für diese Klasse von Inhibitoren irrelevant ist, und dass der Hydroxamatrest durch Chelatisieren des  $Zn^{2+}$  maßgeblich die inhibitorische Aktivität verursacht. Tatsächlich deutet eine neue Kristallstruktur von mit L-Argininhydroxamat komplexiertem LC/A die Existenz einer intermediären Konformation des aktiven



**Schema 4.** Thiol- und Disulfid-Tripeptid-Surrogate mit LC/B-Spaltungsaktivität.



**Schema 5.** Strukturen von Inhibitoren der LC/A-Metalloprotease.

Zentrums an, in der eine intakte  $\text{Zn}^{2+}$ -Koordination mit der Hydroxamatregion sowie eine deutliche Bindung von Asp369 zur Arg-Seitenkette besteht.<sup>[116]</sup>

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde überlegt, dass die Kopplung molekularer Erkennungsgestelle an Hydroxamatreste zu wirksamen Inhibitoren führen könnte. Mithilfe einer einfachen zweistufigen Prozedur wurde ausgehend von Carbonsäurederivaten eine Bibliothek aus 150 Hydroxamsäuren erzeugt.<sup>[117]</sup> Ein erstes Screening ergab 4-Chlorzimthydroxamat (**20**, Schema 5) als vielversprechende Leitstruktur mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $15 \mu\text{M}$ . Anschließend Struktur-Aktivitäts-Studien resultierten in einem 2,4-Dichlor-substituierten Derivat (**21**, Schema 5). **21** ist der bis heute wirksamste nichtpeptidische Inhibitor von LC/A ( $K_i = 0.30 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ). Die Verbindung wirkt kompetitiv, was die geäußerte Hypothese widerlegt, dass mindestens zehn Kohlenstoffatome für eine effektive BoNT-Inhibierung notwendig seien.<sup>[118,119]</sup> Kristallstrukturen von LC/A im Komplex mit den Inhibitoren L-Arg-Hydroxamat, 4-Chlorzimtsäure und 2,4-Dichlorzimtsäure weisen auf eine gewisse Flexibilität des aktiven Zentrums hin und unterstreichen damit die Wahrscheinlichkeit, dass die Substratspezifität von Wechselwirkungen an sekundären Bindungsregionen herrührt.<sup>[120]</sup>

Der Metallchelatorbildner TPEN wurde an hemidiaphragmatischen Nervus-Phrenicus-Präparationen aus Mäusen sowie an einem vollständigen Mausmodell untersucht.<sup>[85,121,122]</sup> Allerdings ist die BoNT-Spezifität gegenüber anderen Metalloproteinen nur gering, sodass die Substanz für klinische Anwendungen nur begrenzt tauglich ist. Eine neuere Untersuchung konnte zeigen, dass EDTA (Ethylen-diamintetraacetat) in zellfreien Assays irreversibel die Proteaseaktivität von BoNT/A und BoNT/E hemmt, im Unterschied zu TPEN aber keine Aktivität in kultivierten Neuronen aufweist.<sup>[123]</sup> Einerseits stützen diese Erkenntnisse vorherige Studien, die eine von  $\text{Zn}^{2+}$  unabhängige EDTA-induzierte Denaturierung der LC-Domäne nahelegen,<sup>[124,125]</sup> sie verdeutlichen aber auch, wie In-vitro- und In-vivo-Experimente voneinander abweichen können. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen einem In-vitro-Screening und einem Bioassay an Mäusen wurde kürzlich bei einer Serie von Zell-

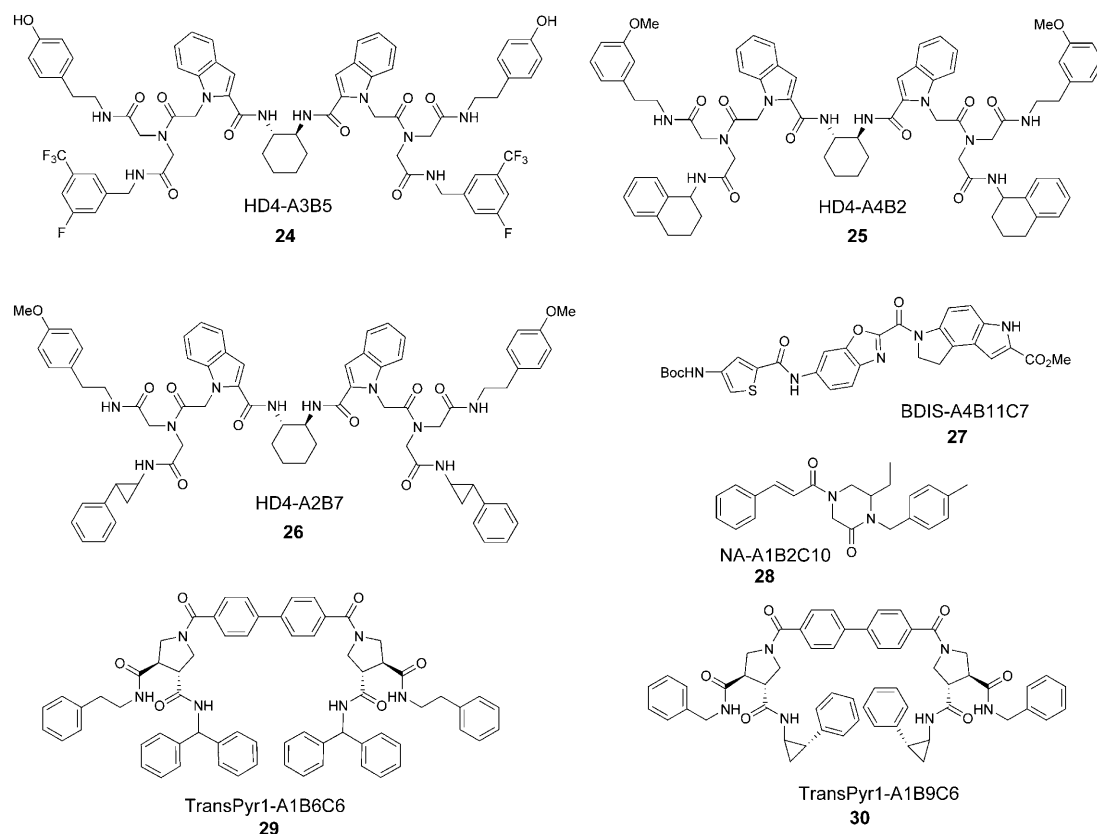
Tier- und In-vitro-FRET-Assays gefunden, bei der Leitstrukturen aus einem Pool von ca. 66000 Verbindungen für die Unterbrechung von Protein-Protein-Wechselwirkungen analysiert wurden.<sup>[126]</sup> Umfangreiche FRET-Screenings und Zellexperimente ergaben sieben Verbindungen (Schema 6) mit vielversprechendem Inhibierungsvermögen, die für nachfolgende In-vivo-Tests geeignet schienen. Jedem der sieben Moleküle fehlte der charakteristische Zink-chelatisierende Rest, was die Vermutung zulässt, dass zusätzliche LC/A-Erkennungsmotive eine Rolle bei der Aktivität der Leitstrukturen spielen könnten. Interessanterweise haben die beiden wirksamsten Inhibitoren, NA-A1B2C10 (**28**; Schema 6) und 2,4-Dichlorzimthydroxamsäure (**21**; Schema 5), eine ähnlich einfache Struktur und ähnliche funktionelle Gruppierungen (Zimtsäure- und Amidreste). Leider deckte die In-vivo-Analyse der beiden Verbindungen auf, dass derzeitige Zellmodelle nicht in der Lage sind, eine Wirksamkeit in vivo vorherzusagen, sodass eine Verbesserung solcher Modelle vorrangig ist. Die Ähnlichkeit zwischen **21** und **28** ist dennoch verheißungsvoll, sodass eine Optimierung von **28** potentere LC/A-Inhibitoren hervorbringen könnte.

Ein überraschender Befund war, dass die einfache geschützte Aminosäure Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (**23**, Schema 5), die gewöhnlich bei der Peptidsynthese zum Einsatz kommt, LC/A kompetitiv inhibiert ( $K_i = 18 \mu\text{M}$ ).<sup>[127]</sup> Ein Docking von **23** in das enzymatisch aktive Zentrum deutete auf eine maßgebliche Bindung zwischen der Fluorenylschutzgruppe und der hydrophoben Kavität sowie auf günstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Carboxylat und einigen nahen, positiv geladenen Seitenketten hin. Dabei ist interessant, dass keine Wechselwirkung zwischen irgendeiner Region des Liganden und dem Zink-Ion im aktiven Zentrum vorhergesagt wird. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit von **23** in einem zellulären Modell untersucht, wobei ein vollständiger Schutz vor SNAP25-Spaltung in Neuro-2a-Zellen bei einer Konzentration von  $60 \mu\text{M}$  erzielt wurde.

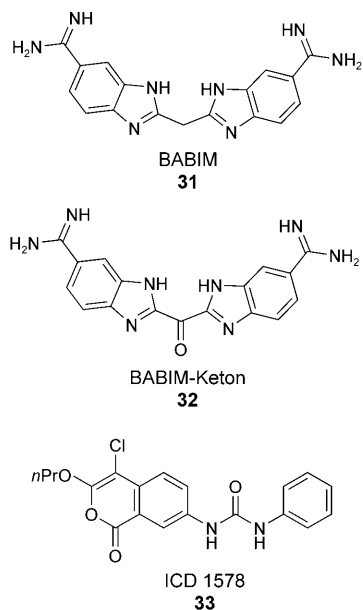
### 3.3.5. Niedermolekulare Inhibitoren der leichten Kette von BoNT/B

Die von Roques und Mitarbeitern beschriebene Pseudotripeptid-Studie ist bis heute die ausführlichste Analyse eines niedermolekularen Liganden, der die VAMP-Bindung an LC/B unterbrechen kann und so eine Inhibierung der Katalyse bewirkt.<sup>[106]</sup> In den letzten zehn Jahren wurden mehrere weitere Studien unternommen, um niedermolekulare Verbindungen zur Inhibierung der LC/B zu identifizieren. Rich, Stevens et al. konnten zeigen, dass Bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methan (BABIM, **31**; Schema 7) die BoNT/B-induzierte Spaltung im niedrigen mikromolaren Bereich hemmt. Das Ketoderivat dieser Verbindung, **32** (Schema 7), erwies sich noch als geringfügig wirksamer.<sup>[128]</sup> Die spezifische Strukturerkennung von BABIM wurde in Vergleichsexperimenten mit dem starken Zink-Chelatbildner 1,10-Phenanthrolin bestätigt, der LC/B nicht inhibierte.

Eine frühere Studie zielte auf die Entwicklung potenzieller LC/B-Inhibitoren ohne Zuhilfenahme von Strukturdaten ab.<sup>[129]</sup> Der Inhibitorwurf beruhte hierbei auf



**Schema 6.** In einem Hochdurchsatz-Screeningassay entdeckte Strukturen von Inhibitoren der LC/A-Metalloprotease.



**Schema 7.** Chemische Strukturen von Inhibitoren der LC/B-Metalloprotease.

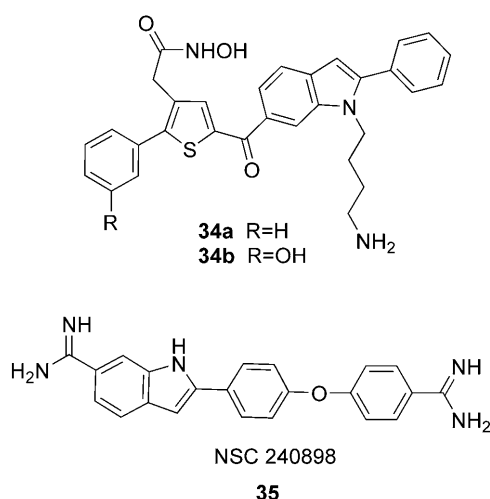
Strukturgleichheiten mit einem zuvor untersuchten, nur wenig aktiven Phosphoramidon. Bei der analysierten Substanz handelte es sich um das Cumarinderivat ICD 1578 (**33**, Schema 7), das eine moderate Inhibierung mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $28 \mu\text{M}$  erzielte. Erwähnenswert ist, dass der Zinkprotease-Inhibitor Captopril in millimolarer Konzentration

nur eine Inhibierung von weniger als 10 % erzielte, was die Notwendigkeit von Schlüsselerkennungsregionen im Molekül unterstreicht.<sup>[129]</sup>

### 3.3.6. Strukturgeleitetes Screening und Pharmakophorentwicklung

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung niedermolekularer LC/A-Inhibitoren umfasste ein Screening der Diversitätsdatenbank des National Cancer Institute (NCI). Dabei wurden mehrere 4-Aminochinoline gefunden, die die Wirkung BoNT/A-induzierter Effekte auf die neuromuskuläre Transmission verzögerten.<sup>[119]</sup> Einige Verbindungen, die in Konzentrationen von  $20 \mu\text{M}$  eine Inhibierung von  $> 50 \%$  erzielten, wurden im Komplex mit BoNT/A modelliert,<sup>[45]</sup> um allgemeine Pharmakophor-Strukturgerüste vorherzusagen. Mit dem gleichen Ziel wurde in einer weiteren Studie ein computerbasiertes Screening von 2.5 Millionen Verbindungen ausgeführt.<sup>[118]</sup> Ausgangspunkt waren Moleküldynamiksimulationen (Cationic-Dummy-Ansatz; CaDA) des Zink-Endopeptidase-Inhibitor-Komplexes.<sup>[130]</sup> Nach umfangreichen strukturgeleiteten Modifizierungen wurde ein kompetitiver Inhibitor (**34a**, Schema 8) mit einem  $K_i$ -Wert von  $12 \mu\text{M}$  erhalten.<sup>[118]</sup> Weitere Analysen und Optimierungen von **34a** führten zu einem geringfügig wirksameren Derivat mit einem zusätzlichen 3-Hydroxyphenylrest (**34b**, Schema 8).<sup>[131]</sup> Der Erfolg dieser Ansätze bestätigt die Eignung von Moleküldynamiksimulationen für die Entwicklung von BoNT-Inhibitoren.



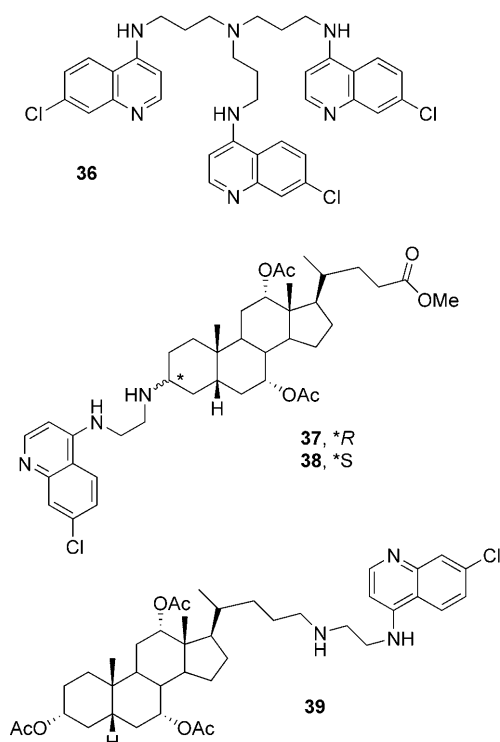


**Schema 8.** Durch strukturgelenktes Screening identifizierte Strukturen niedermolekularer LC/A-Inhibitoren.

Der wirksame LC/A-Inhibitor mpp-RATKML<sup>[101]</sup> wurde jüngst ebenfalls in einer Dockingstudie verwendet, um seine für die Inhibierung benötigten Hauptkomponenten zu identifizieren.<sup>[132]</sup> Die Studie basierte auf einer Kristallstruktur der LC/A,<sup>[133]</sup> es kamen aber Bedenken auf, ob diese mit der biologisch aktiven Form in Lösung konsistent sei. Empirische Vergleichsdaten zwischen mpp-RATKML und mpp-KATKML hatten gezeigt, dass das Lys-substituierte Peptid mehr als 1000fach weniger aktiv sein sollte, wogegen die Modellierung auf der Grundlage der Kristallstrukturdaten für beide Peptide energetisch günstige Konformationen mit ähnlichen Wechselwirkungen der protonierten Lys- und Arg-Seitenketten ergab. Ein weiteres widersprüchliches Ergebnis war die Positionierung des Thiolrests von mpp-RATKML in der Bindungsspalte der nativen<sup>198</sup>RATKM<sup>203</sup>L-Sequenz von SNAP25: Zwischen dem Schwefelatom und dem Zinkion bestand ein Abstand von ca. 7 Å, was die Möglichkeit einer S-Zn<sup>2+</sup>-Koordination ausschließt. In der Folge führte man eine Moleküldynamikstudie aus, bei der günstige Oberflächenkonformationen zwischen mpp-RATKML und LC/A verwendet wurden. In Einklang mit den empirischen Daten wurde ein Modell entwickelt, in dem die Konformation des Bindungszentrums eine starke energetische Präferenz von Arg gegenüber Lys aufwies. Zusätzliche Anforderungen an das Modell waren die Platzierung der Thiolgruppe von mpp-RATKML in räumlicher Nähe zum Zn<sup>2+</sup> (zur Koordination) sowie die Vermeidung hydrophob-polarer Abstoßungskräfte zwischen der Isobutylgruppe von Leu und der Phenylgruppe von mpp mit Wasser. Anhand der ermittelten Moleküldynamikdaten wurden einige Hauptanforderungen an einen potenten niedermolekularen Inhibitor postuliert: eine aromatische Gruppe, die mit einem planar-kationischen Rest verknüpft ist (z. B. Guanidinium), eine protonierte Aminogruppe, mindestens zwei planare Regionen im Abstand von 6.5–13 Å und eine Gesamtmoleküllänge von ungefähr 23 Å. Eine Suche nach nicht-peptidischen niedermolekularen Verbindungen in der NCI-Diversitätsdatenbank ergab mehrere potenzielle LC/A-Inhibitoren, die diesen Vorgaben genügen. Die vielversprechendste Verbindung war NSC240898 (**35**,

Schema 8), die einen deutlichen dosisabhängigen Schutz von SNAP25 in Hühnerneuronen zeigte, einhergehend mit einer guten Zelltoleranz von bis zu 40 µM.<sup>[132]</sup>

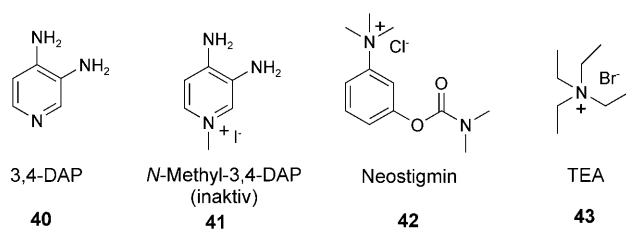
Unter Verwendung des verfeinerten Achtkomponenten-Pharmakophormodells konnten vier Inhibitoren für In-vitro-Untersuchungen mit LC/A identifiziert (Schema 9) und synthetisiert werden,<sup>[134]</sup> von denen alle IC<sub>50</sub>-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich aufwiesen (3–17 µM). Ein besonderes Strukturmerkmal von drei der neuen Inhibitoren war ein zusätzliches Erkennungsmotiv in einer steroidischen Region, das als hydrophober Anker an der Kante der Bindungsspalte fungierte. Allerdings wies der wirksamste dieser Inhibitoren anstelle des Steroidankers ein Tris(aminochlorchinolin)-Motiv auf (**36**, Schema 9).



**Schema 9.** Auf Aminochlorchinolin (ACQ) basierende Inhibitoren der LC-Domäne von BoNT.

### 3.4. K<sup>+</sup>-Antagonisten

K<sup>+</sup>-Kanäle sind für praktisch alle Arten von Zellen überlebenswichtig<sup>[135]</sup> und bilden eine bemerkenswert vielseitige Gruppe von Ionenkanalstrukturen. Der zuerst aufgeklärte K<sup>+</sup>-Kanal war der klassische spannungsaktivierte Kanal des Kalmars. Andere Kanaltypen sind hyperpolarisierende, von Metaboliten und Sekundärbotenstoffen gesteuerte Spannungskanäle, transiente, nach außen gerichtete Kanäle (A-Ströme) sowie hoch leitfähige, Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (BKCa-Kanäle). BKCa-Kanäle bestehen aus einer porenbildenden α-Untereinheit und einer regulatorischen β-Untereinheit, und man nimmt typischerweise an, dass sie auf Tetramethylammonium (TEA, **43**, Schema 10) ansprechen. Die Aussicht, BKCa-Antagonisten als Therapie gegen Botulismus einzusetzen, gründet sich auf der Fähigkeit der Antagonisten,



**Schema 10.** Chemische Strukturen von  $K^+$ -Antagonisten und das inaktive N-Methyl-3,4-DAP $^+$ -Derivat.

einen Calciuminflux zu induzieren und damit einen Acetylcholinefflux aus der Zelle zu verursachen. Solche Substanzen könnten insbesondere in der Lage sein, BoNT-induzierte Lähmungen rückgängig zu machen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass TEA sowohl in vitro<sup>[136]</sup> als auch in Tiermodellen<sup>[137,138]</sup> BoNT-induzierte Lähmungserscheinungen umkehren kann.

Als bester  $K^+$ -Antagonist zur Botulismusbekämpfung gilt 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP, **40**, Schema 10), das in vitro hocheffektiv motorischen Lähmungen nach einer BoNT-Exposition entgegenwirkt und von allen derzeit verfügbaren  $K^+$ -Antagonisten die geringste Toxizität aufweist.<sup>[139]</sup> Der Schmerztonus von durch BoNT gelähmten Rattenzwerchfellmuskeln wurde durch Behandlung mit 3,4-DAP rasch und mit mindestens 8 h nach Verabreichung andauernder Mobilität wiederhergestellt. Adler und Mitarbeiter kombinierten In-vitro- und In-vivo-Messungen, um die Wirkung von 3,4-DAP am *Digitum-longus*-Muskel in Ratten nach lokaler BoNT-Lähmung zu untersuchen und demonstrierten einen deutlich erhöhten Schmerztonus im vergifteten Muskel ohne Mobilitätsverlust mit der Zeit oder nach wiederholter Verabreichung.<sup>[140]</sup> Eine konstante Verabreichung von 3,4-DAP während der Intoxikationsphase erwies sich wegen der schnellen Clearance der Substanz als notwendig. Osmotische Minipumpen für die Verabreichung von 3,4-DAP wurden verwendet.<sup>[141]</sup>

Trotz der vielversprechenden Eigenschaften von 3,4-DAP zur Botulismusbekämpfung weist die Verbindung einige deutliche Nachteile auf. So ist die Wirkung von 3,4-DAP hauptsächlich auf BoNT/A beschränkt. Auch wenn die markanteste Wirkung von 3,4-DAP in der Verbesserung der Muskelkontraktion besteht, ist dieser Effekt bei respiratorischen Muskeln nur minimal, sodass kein Wiedereinsetzen spontaner Atemtätigkeit beobachtet werden konnte. Eine kritische Nebenwirkung von 3,4-DAP sind epileptische Anfälle, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Fähigkeit der Substanz resultieren, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Um einige dieser Probleme zu überwinden, wurden Kombinationen von 3,4-DAP mit Neostigmin (**42**, Schema 10) und TEA getestet.<sup>[139]</sup> Ziel war es, die toxische Wirkung von 3,4-DAP durch Senkung der Dosis abzuschwächen und einen gegenüber der Einzelverabreichung verstärkten Acetylcholinefflux zu erzielen. Man war davon ausgegangen, dass eine Kombinationstherapie mit Neostigmin und 3,4-DAP die AcetylcholinKonzentration durch eine Neostigmin-induzierte Inhibierung der Acetylcholinesterase in peripheren Geweben erhöht. Leider konnte jedoch kein günstiger Effekt beobachtet werden. In Kombination mit TEA war die Inhibitor-

wirkung von 3,4-DAP sogar abgeschwächt, was die Vermutung nahelegt, dass die Wirkung von TEA an nikotinergen Ionenkanälen dem günstigen Einfluss von TEA auf die Transmitterausschüttung entgegenwirkt. Obwohl beide Strategien keinen Erfolg brachten, bleibt das Konzept „kombinierter“ Kanal-Antagonisten zur Behandlung von BoNT-Intoxikationen vielversprechend.

Adler et al. bestimmten den Bindungsort von 3,4-DAP am Nervenende und erbrachten damit weitere Einblicke in dessen Wirkungsweise.<sup>[139]</sup> 3,4-Diamino-1-methylpyridinium (**41**, Schema 10), ein kationisches 3,4-DAP-Derivat, wurde ebenfalls an hemidiaphragmatischen Nervus-Phrenicus-Präparaten aus Ratten getestet und verursachte selbst in millimolaren Konzentrationen keine oder nur geringe Effekte. Das Unvermögen des Pyridinderivats, eine Erhöhung der Muskelspannung durch Bindung von  $K^+$ -Ionenkanälen zu erzielen, deutet darauf hin, dass die Wirkung von 3,4-DAP an der inneren Membranoberfläche erfolgen muss, einer für geladene Spezies sehr ungünstigen Umgebung.

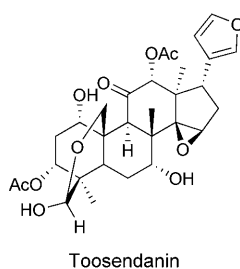
Die Wirkung von  $K^+$ -Antagonisten gegen BoNT/A kann generell der Fähigkeit zugeschrieben werden, durch die Inhibierung spannungsabhängiger  $K^+$ -Ströme einen  $Ca^{2+}$ -Influx zu induzieren. Weitergehende Studien zur Entwicklung optimierter 3,4-DAP-Derivate mit erhöhter Wirksamkeit und verringerter Toxizität sind von beträchtlichem Interesse. Einer praktischen Umsetzung dieses Ansatzes als Therapie bei BoNT-Intoxikationen steht aber noch prinzipiell entgegen, dass  $K^+$ -Antagonisten über eine Dauer von Wochen oder Monaten verabreicht werden müssen, um einen messbaren Schutz zu gewährleisten.

### 3.5. Therapeutika mit unbestimmter Wirkungsweise

Theaflavine, die aktiven Bestandteile, die bei der Fermentation von grünem zu schwarzem Tee entstehen, können durch Polymerisation eine Thearubigin-Fraktion bilden (neben anderen komplexen Polyphenolen), die gegen die Effekte von BoNT/A, /B und /E aktiv ist.<sup>[142]</sup> Nishimura und Mitarbeiter verwendeten zerebrokortikale Synaptosomen aus Ratten und exponierten diese mit  $^{125}I$ -markiertem BoNT, um den Mechanismus der Thearubigin-Fraktion zu untersuchen.<sup>[143]</sup> Leider konnten auf diese Art keine Informationen über die Identität der aktiven Moleküle gewonnen werden, und die einzige Schlussfolgerung war, dass die Wirkung der Thearubigin-Fraktion auf der einfachen Bindung des Toxins beruht.

Limonoide sind von Euphan oder Tirucallan-Triterpenoiden abgeleitete Tetranortriterpenoide mit 4,4,8-Trimethylfuranylsteroid-Skelett, die einen intensiv bitteren Geschmack haben.<sup>[144]</sup> Von dem Baum *Melia toosendan* stammende Limonoide sind seit vielen Jahren für ihre antihelminthische Wirkung bekannt.<sup>[145]</sup> Ein Hauptbestandteil der Limonoidfamilie von *M. toosendan* ist die Verbindung Toosendanin (**44**, Schema 11), die multiple Wirkungsweisen in Insekten zeigt.<sup>[146]</sup>

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden mehrere Studien veröffentlicht, die den Effekt von Toosendanin auf die Neurotransmitterausschüttung an motorischen Endplatten be-



44

Schema 11. Chemische Struktur des Limonoids Toosendanin.

schreiben.<sup>[147]</sup> Insgesamt erweist sich Toosendanin als ein selektiver präsynaptischer Inhibitor, der die quantisierte Ausschüttung von Acetylcholin blockiert.<sup>[148]</sup> Dem Blockiereffekt des Toosendanins geht eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Vermittlerphase voraus – ein im direkten Gegensatz zu den BoNT-Effekten auftretendes Phänomen. Eine bemerkenswerte Beobachtung in einer der BoNT-Studien mit Toosendanin war, dass die motorischen Endplatten während der Vermittlungsphase eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber BoNT aufweisen.<sup>[149]</sup>

Andere Untersuchungen zur Klärung des Toosendanin-Mechanismus erbrachten Hinweise, dass die Substanz die Empfindlichkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  senkt und letztlich völlig unterdrückt. Dieser Effekt ist die Ursache für die beobachtete Beschränkung des spannungsabhängigen  $\text{K}^{+}$ -Stroms in Neuroblastom-Gliom-Hybridzellen.<sup>[150]</sup> Toosendanin wurde auch als Auslöser für submikroskopische Veränderungen an der motorischen Endplatte identifiziert; so verringerte Toosendanin die Menge an synaptischen Vesikeln, und es vergrößerte den Synapsenumfang.<sup>[151]</sup> Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Toosendanin den verzögert gleichrichtenden  $\text{K}^{+}$ -Kanal durch extrazelluläre und/oder intrazelluläre Anlagerung hemmt.<sup>[152]</sup>

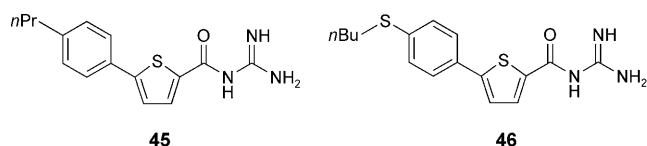
Die membranpermeabilisierende und ionenkanalmodulierende Wirkung von Toosendanin könnte auf dessen Fähigkeit zurückzuführen sein, Membrandoppelschichten zu durchspannen und die Integrität von Kanälen zu verändern. Da BoNT die Eigenschaft hat, Ionenkanäle in synthetischen Doppelschichten und in PC12-Zellmembranen auszubilden,<sup>[153]</sup> ist diese Wirkung des Toosendanins von großer Bedeutung. Zusätzlich führt die Behandlung von Synaptosomen mit Toosendanin zu einer Resistenz der BoNT/A-vermittelten Spaltung von SNAP25. Bedenkt man die Korrelation von BoNT-Translokation und Kanalbildung, so lassen diese Befunde vermuten, dass die Wirkung von Toosendanin auf eine Störung der LC-Translokation zurückgeht. Trotz aller Befunde steht aber ein genaues mechanistisches Bild von der Wirkungsweise des Toosendanins als BoNT-Antagonist noch aus.

## 4. BoNT/A-Agonismus

### 4.1. Niedermolekulare Aktivatoren

BoNT/A ist ein erfolgreiches Medikament gegen mindere Beschwerden. Allerdings fand man, dass es eine Immunre-

aktion auslöst und neutralisierende Antikörper erzeugt, die seine Wirksamkeit deutlich mindern.<sup>[8,9,154]</sup> In extremen Fällen kann der Patient keinerlei Reaktion auf die Medikamentengabe zeigen. Mehrere Strategien wurden verfolgt, um der abgeschwächten Wirkung des Toxins zu begegnen: 1) Erhöhung der Toxinreinheit, 2) Verringerung der Dosis zur Minimierung der Immunreaktion, 3) Verlängerung der Behandlungsintervalle und 4) Verwendung eines anderen BoNT-Serotyps. Ein weiterer Ansatz besteht in der Entwicklung von BoNT/A-Agonisten, die eine geringere Dosierung von BoNT/A unter Erhaltung der hohen Metalloproteaseaktivität ermöglichen. Eine Struktur-Aktivitäts-Studie von 2-Acylguanidin-5-phenylthiophenen bezüglich des Agonismus der BoNT/A-vermittelten Katalyse ergab, dass eine Reihe niedermolekularer Substanzen eine „Superaktivierung“ von LC/A bewirken kann.<sup>[155]</sup> In Anbetracht der funktionellen Ähnlichkeit zwischen dem LC/A-Inhibitor L-Argininhydroxamsäure und 2-Acylthiophen ( $\text{Zn}^{2+}$ -bindender Rest) sowie Acylguanidin (Arg-Analagon), lag die erste Absicht zunächst in der Entwicklung eines wirksamen LC/A-Inhibitors. Überraschenderweise wurde aber das gegenteilige Phänomen beobachtet: Die beiden bemerkenswerten Verbindungen **45** und **46** (Schema 12) bewirkten eine erstaunli-



Schema 12. 2-Acylguanidyl-5-phenylthiophene mit 14fach verstärkter Aktivierung der LC/A-Spaltung.

che Aktivierung, einhergehend mit einer um bis zu 14fach beschleunigten Spaltung von SNAP25 (**46**).<sup>[155]</sup> Zunächst wurde erwartet, dass die Proteaseaktivierung durch derartige Verbindungen auf ihre tensidähnlichen Eigenschaften zurückzuführen sei, da Fälle mit ähnlichen Phänomenen in der Literatur beschrieben sind.<sup>[156,157]</sup> Jedoch schließt das Aktivierungsprofil bei Konzentrationen unter der kritischen micellaren Konzentration (CMC) die Möglichkeit eines tensidähnlichen Mechanismus aus, da eine Aktivierung von Proteasen durch Tenside ausschließlich bei Konzentrationen oberhalb der CMC auftritt, wie es z. B. bei Chymotrypsin der Fall ist.<sup>[156,157]</sup>

### 4.2. BoNT-basierte Peptide

Ein Beispiel für die Anwendung synthetischer, auf BoNT basierender Peptide, ist das Hexapeptid Acetyl-EEMQRR- $\text{NH}_2$ .<sup>[158,159]</sup> Das Peptid findet als Antifaltenmittel Verwendung, ähnlich wie das auf natürlichem BoNT/A basierende Botox. Es wurde nachgewiesen, dass das unter dem Namen Argirelin bekannte Peptid auf ähnliche Weise wie BoNT/A wirkt, indem es die Catecholaminausschüttung in Chromaffinzellen verhindert und zusätzlich die Falentiefe bei gesunden Testpersonen verringert. Argirelin ist deutlich weniger wirksam als BoNT/A, dafür aber auch sehr viel weniger toxisch ( $> 2000 \text{ mg kg}^{-1}$ ; BoNT/A:  $20 \text{ ng kg}^{-1}$ ).<sup>[158]</sup>



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ähnlich wie Dr. Jekyll und Mr. Hyde die menschliche Zwiespaltigkeit repräsentieren, tragen die Botulinum-Neutotoxine zwei scheinbar unvereinbare Merkmale in sich. Einerseits gibt es zahlreiche therapeutische und kosmetische Anwendungen, andererseits sind es potenziell gefährliche Substanzen für Zwecke wie biologische Kriegsführung und Bioterrorismus. Letztlich haben beide Wirkungsweisen ihren Ursprung in der Fähigkeit der Botulinum-Toxine, neuromuskuläre Funktionen durch Inhibierung der Acetylcholin-ausschüttung in den synaptischen Spalt zu unterbinden, was in fortgeschrittenen Stadien der Vergiftung zum Tod durch Herzstillstand oder Atemlähmung führt.

Jüngste Ereignisse wie der 11. September 2001 haben zu einer deutlich verbesserten Finanzierung der Bioterrorismusforschung seitens staatlicher Behörden geführt, was letztlich viele Erkenntnisse zu möglichen Präventionsmaßnahmen gegen Bioanschläge mit BoNT eingebracht hat. Fortschritte bei der Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen und dem biochemischen Mechanismus hatten ein ausgereifteres Impfstoffdesign zur Folge und leiteten eine neue Ära in der Entwicklung niedermolekularer BoNT-Inhibitoren ein. Allerdings ist die therapeutische Anwendung aller beschriebenen Substanzen mit einigen Problemen verbunden, z.B. begrenzten Aktivitätszeitfenstern, schlechten Zellgängigkeiten und kurzen Serumhalbwertszeiten. Die Herausforderung für die Zukunft besteht klar in der Optimierung dieser Antagonisten – dies erfordert vor allem vermehrte Forschungsanstrengungen bei der Validierung von Modellsystemen (zellbasierte Systeme,<sup>[126]</sup> Bioassays), die eine verlässliche Vorhersage der Wirksamkeit in vivo ermöglichen. Insbesondere braucht es ein Modell, das der intrazellulären Umgebung der LC/A-Metalloprotease nach ihrer endosomalen Translokation präzise nachempfunden ist. Von besonderem Interesse sind außerdem niedermolekulare Liganden mit neuartigen Inhibierungsmechanismen als Alternative zu den kompetitiven Inhibitoren der LC-Domäne. Techniken der kombinatorischen Chemie, z.B. Hochdurchsatz-Screenings, könnten beispiellose Entdeckungen im molekularen Mechanismus von BoNT-Intoxikationen ermöglichen und leistungsfähige Werkzeuge für die Auffindung von Leitstrukturen zur Entwicklung der nächsten Generation von Botulismus-Therapeutika bereitstellen.

*Wir danken Naomi Sleder für ihre Hilfe bei der Erstellung von Abbildung 1. Dem Skaggs Institute for Chemical Biology und den National Institutes of Health danken wir für die finanzielle Unterstützung (AI66507 and AI30050).*

Eingegangen am 4. Dezember 2007  
Übersetzt von Florian Buhr, Frankfurt

- [1] E. J. Schantz, E. A. Johnson, *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 80–99.
- [2] B. R. Singh, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 617–619.
- [3] J. Kerner, *Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorfallenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuss geräucherter Würste*, Osiander, Tübingen, **1820**.

- [4] J. Kerner, *Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, ein Beytrag zur Untersuchung des in verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes*, Cotta, Stuttgart, **1822**.
- [5] J. G. Steinbuch, *Tueb. Bl. Naturwiss. Arzneykunde* **1817**, 3, 26–52.
- [6] J. Kerner, *Tueb. Bl. Naturwiss. Arzneykunde* **1817**, 3, 1–25.
- [7] E. P. M. Van Ermengem, *Z. Hyg. Infektionskrankh.* **1897**, 26, 1–56.
- [8] D. D. Truong, W. H. Jost, *Parkinsonism Relat. Disord.* **2006**, 12, 331–355.
- [9] R. Hackett, P. C. A. Kam, *Med. Chem.* **2007**, 3, 333–345.
- [10] S. S. Arnon, R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat, *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, 285, 1059–1070.
- [11] S. L. Osborne, C. F. Latham, P. J. Wen, S. Cavaignac, J. Fanning, P. G. Foran, F. A. Meunier, *J. Neurosci. Res.* **2007**, 85, 1149–1158.
- [12] K. Oguma, Y. Fujinaga, K. Inoue, *Microbiol. Immunol.* **1995**, 39, 161–168.
- [13] G. Schiavo, M. Matteoli, C. Montecucco, *Physiol. Rev.* **2000**, 80, 717–766.
- [14] L. L. Simpson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, 44, 167–193.
- [15] C. Montecucco, *Trends Biochem. Sci.* **1986**, 11, 314–317.
- [16] M. Kitamura, M. Iwamori, Y. Nagai, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1980**, 628, 328–335.
- [17] M. Kitamura, K. Takamiya, S. Aizawa, K. Furukawa, K. Furukawa, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, 1441, 1–3.
- [18] A. Rummel, T. Eichner, T. Weil, T. Karnath, A. Gutcaits, S. Mahrhold, K. Sandhoff, R. L. Proia, K. R. Acharya, H. Bigalke, T. Binz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 359–364.
- [19] M. R. Baldwin, J. J. Kim, J. T. Barbieri, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, 14, 9–10.
- [20] G. Matthews, *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, 19, 219–233.
- [21] W. J. Betz, J. K. Angleson, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, 60, 347–363.
- [22] M. R. Baldwin, J. T. Barbieri, *Biochemistry* **2007**, 46, 3200–3210.
- [23] M. Matteoli, K. Takei, M. S. Perin, T. C. Südhof, P. De Camilli, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 849–861.
- [24] S. Mahrhold, A. Rummel, H. Bigalke, B. Davletov, T. Binz, *FEBS Lett.* **2006**, 580, 2011–2014.
- [25] M. Dong, F. Yeh, W. H. Tepp, C. Dean, E. A. Johnson, R. Janz, E. R. Chapman, *Science* **2006**, 312, 592–596.
- [26] K. Sandvig in *Bacterial Protein Toxins* (Hrsg.: D. L. Burns, J. T. Barbieri, B. H. Iglewski), American Society for Microbiology, Washington, **2003**, S. 157–172.
- [27] L. L. Simpson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, 222, 43–48.
- [28] D. H. Hoch, M. Romero-Mira, B. E. Ehrlich, A. Finkelstein, B. R. DasGupta, L. L. Simpson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1692–1696.
- [29] L. K. Koriavova, M. Montal, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 13–18.
- [30] A. Fischer, M. Montal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 10447–10452.
- [31] A. Fischer, M. Montal, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 29604–29611.
- [32] Y. Humeau, F. Doussau, N. J. Grant, B. Poulain, *Biochimie* **2000**, 82, 427–446.
- [33] F. A. Meunier, G. Schiavo, J. Molgó, *J. Physiol.* **2002**, 96, 105–113.
- [34] G. Schiavo, F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Lauro, B. R. DasGupta, C. Montecucco, *Nature* **1992**, 359, 832–835.
- [35] S. Chen, J. T. Barbieri, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 10906–10911.

- [36] S. Chen, J. T. Barbieri, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 25540–25547.
- [37] S. Chen, J. J. Kim, J. T. Barbieri, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 9621–9627.
- [38] M. A. Fiock, M. A. Cardella, N. F. Gearing, *J. Immunol.* **1963**, 90, 697–702.
- [39] L. S. Siegel, *J. Clin. Microbiol.* **1988**, 26, 2351–2356.
- [40] L. S. Siegel, *J. Clin. Microbiol.* **1989**, 27, 1906–1908.
- [41] M. P. Byrne, L. A. Smith, *Biochimie* **2000**, 82, 955–966.
- [42] C. L. Pier, W. H. Tepp, M. Bradshaw, E. A. Johnson, J. T. Barbieri, M. R. Baldwin, *Infect. Immun.* **2008**, 76, 437–442.
- [43] N. F. Fairweather, V. A. Lyness, D. J. Maskell, *Infect. Immun.* **1987**, 55, 2541–2545.
- [44] D. B. Lacy, R. C. Stevens, *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 1091–1104.
- [45] D. B. Lacy, W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 898–902.
- [46] C. Montecucco, G. Schiavo, *Q. Rev. Biophys.* **1995**, 28, 423–472.
- [47] D. E. Thompson, J. K. Brehm, J. D. Oultram, T. J. Swinfield, C. C. Shone, T. Atkinson, J. Melling, N. P. Minton, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 189, 73–81.
- [48] H. F. LaPenotiere, M. A. Clayton, J. L. Middlebrook, *Toxicon* **1995**, 33, 1383–1386.
- [49] M. A. Clayton, J. M. Clayton, D. R. Brown, J. L. Middlebrook, *Infect. Immun.* **1995**, 63, 2738–2742.
- [50] L. A. Smith, *Toxicon* **1998**, 36, 1539–1548.
- [51] M. P. Byrne, T. J. Smith, V. A. Montgomery, L. A. Smith, *Infect. Immun.* **1998**, 66, 4817–4822.
- [52] K. J. Potter, M. A. Bevins, E. V. Vassilieva, V. R. Chiruvolu, T. Smith, L. A. Smith, M. M. Meagher, *Protein Expression Purif.* **1998**, 13, 357–365.
- [53] K. J. Potter, W. Zhang, L. A. Smith, M. M. Meagher, *Protein Expression Purif.* **2000**, 19, 393–402.
- [54] M. R. Baldwin, W. H. Tepp, C. L. Pier, M. Bradshaw, M. Ho, B. A. Wilson, R. B. Fritz, E. A. Johnson, J. T. Barbieri, *Infect. Immun.* **2005**, 73, 6998–7005.
- [55] M. P. Dux, R. Barent, J. Sinha, M. Gouthro, T. Swanson, A. Barthuli, M. Inan, J. T. Ross, L. A. Smith, T. J. Smith, R. Webb, B. Loveless, I. Henderson, M. M. Meagher, *Protein Expression Purif.* **2006**, 45, 359–367.
- [56] J. C. Lee, H. J. Hwang, Y. Sakaguchi, Y. Yamamoto, H. Arimitsu, T. Tsuji, T. Watanabe, T. Ohyama, T. Tsuchiya, K. Oguma, *Microbiol. Immunol.* **2007**, 51, 445–455.
- [57] R. P. Webb, T. J. Smith, P. M. Wright, V. A. Montgomery, M. M. Meagher, L. A. Smith, *Vaccine* **2007**, 25, 4273–4282.
- [58] J. Boles, M. West, V. Montgomery, R. Tammariello, M. L. Pitt, P. Gibbs, L. Smith, R. D. LeClaire, *Toxicon* **2006**, 47, 877–884.
- [59] P. Pushko, M. Parker, G. V. Ludwig, N. L. Davis, R. E. Johnston, J. F. Smith, *Virology* **1997**, 239, 389–401.
- [60] J. L. Middlebrook, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 1415–1423.
- [61] M. Zeng, Q. Xu, M. Elias, M. E. Pichichero, L. L. Simpson, L. A. Smith, *Vaccine* **2007**, 25, 7540–7548.
- [62] J. S. Lee, P. Pushko, M. D. Parker, M. T. Dertzbaugh, L. A. Smith, J. F. Smith, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 5709–5715.
- [63] R. H. Shyu, M. F. Shaio, S. S. Tang, H. F. Shyu, C. F. Lee, M. H. Tsai, J. E. Smith, H. H. Huang, J. J. Wey, J. L. Huang, H. H. Chang, *J. Biomed. Sci.* **200**, 7, 51–57.
- [64] A. P. Jathoul, J. L. Holley, H. S. Garmory, *Vaccine* **2004**, 22, 3942–3946.
- [65] J. Clayton, J. L. Middlebrook, *Vaccine* **2000**, 18, 1855–1862.
- [66] A. Casadevall, *Emerging Infect. Dis.* **2002**, 8, 833–841.
- [67] C. O. Tacket, W. X. Shandera, J. M. Mann, N. T. Hargrett, P. A. Blake, *Am. J. Med.* **1984**, 76, 794–798.
- [68] R. E. Black, R. A. Gunn, *Am. J. Med.* **1980**, 69, 567–570.
- [69] S. S. Arnon, R. Schechter, S. E. Maslanka, N. P. Jewell, C. L. Hatheway, *N. Engl. J. Med.* **2006**, 354, 462–471.
- [70] A. Norrby-Teglund, H. Basma, J. Anderson, A. McGeer, D. E. Low, M. Kotb, *Clin. Infect. Dis.* **1998**, 26, 631–638.
- [71] A. Farrugia, P. Poullis, *Prog. Transfus. Med.* **2001**, 11, 63–74.
- [72] H. B. Slade, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1994**, 1, 613–619.
- [73] P. T. Jones, P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, G. Winter, *Nature* **1986**, 321, 522–525.
- [74] J. D. Marks, *Mov. Disord.* **2004**, 19, S101–S108.
- [75] S. Kozaki, Y. Kamata, T. Nagai, J. Ogasawara, G. Sakaguchi, *Infect. Immun.* **1986**, 52, 786–791.
- [76] S. Bavari, D. D. Pless, E. R. Torres, F. J. Lebeda, M. A. Olson, *Vaccine* **1998**, 16, 1850–1856.
- [77] D. D. Pless, E. R. Torres, E. K. Reinke, S. Bavari, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 570–574.
- [78] G. H. Yang, K. S. Kim, H. W. Kim, S. T. Jeong, G. H. Huh, J. C. Kim, H. H. Jung, *Toxicon* **2004**, 44, 19–25.
- [79] P. Amersdorfer, C. Wong, S. Chen, T. Smith, S. Deshpande, R. Sherican, R. Finnern, J. D. Marks, *Infect. Immun.* **1997**, 65, 3743–3752.
- [80] P. Amersdorfer, C. Wong, T. Smith, S. Chen, S. Deshpande, R. Sheridan, J. D. Marks, *Vaccine* **2002**, 20, 1640–1648.
- [81] D. C. Mah, W. G. Hu, J. K. Pon, S. A. Masri, R. E. Fulton, P. L. Monette, L. P. Nagata, *Hybridoma Hybridomics* **2003**, 22, 277–283.
- [82] B. Hallis, S. Fooks, C. Shone, P. Hambleton in *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects* (Hrsg.: B. R. DasGupta), **1993**, Plenum, New York, S. 433–436.
- [83] A. Nowakowski, C. Wang, D. B. Powers, P. Amersdorfer, T. J. Smith, V. A. Montgomery, R. Sheridan, R. Blake, L. A. Smith, J. D. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11346–11350.
- [84] L. L. Simpson, M. M. Rapport, *J. Neurochem.* **1971**, 18, 1751–1759.
- [85] L. L. Simpson, M. M. Rapport, *J. Neurochem.* **1971**, 18, 1341–1343.
- [86] Y. Kamata, M. Yoshimoto, S. Kozaki, *Toxicon* **1997**, 35, 1337–1340.
- [87] R. R. Kale, C. M. Clancy, R. M. Vermillion, E. A. Johnson, S. S. Iyer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2459–2464.
- [88] N. Bakry, Y. Kamata, L. L. Simpson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, 258, 830–836.
- [89] L. L. Simpson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, 225, 546–552.
- [90] L. L. Simpson, J. A. Coffield, N. Bakry, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 269, 256–262.
- [91] R. E. Sheridan, *Toxicon* **1996**, 34, 849–855.
- [92] J. E. Keller, F. Cai, E. A. Neale, *Biochemistry* **2004**, 43, 526–532.
- [93] S. S. Deshpande, R. E. Sheridan, M. Adler, *Toxicon* **1997**, 35, 433–445.
- [94] M. Adler, R. E. Dinterman, R. W. Wannemacher, *Toxicon* **1997**, 35, 1089–1100.
- [95] T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. E. Rothman, *Nature* **1993**, 362, 318–324.
- [96] O. Rossetto, G. Schiavo, C. Montecucco, B. Poulain, F. Deloye, L. Lozzi, C. C. Shone, *Nature* **1994**, 372, 415–416.
- [97] J. Hayden, J. Pires, M. Hamilton, G. Moore, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **2000**, 43, 71–74.
- [98] J. Hayden, J. Pires, S. Roy, M. Hamilton, G. J. Moore, *J. Appl. Toxicol.* **2003**, 23, 1–7.
- [99] G. J. Moore, D. M. Moore, S. S. Roy, L. J. Hayden, M. G. Hamilton, N. W. C. Chan, W. E. Lee, *Mol. Diversity* **2006**, 10, 9–16.
- [100] J. J. Schmidt, R. G. Stafford, K. A. Bostian, *FEBS Lett.* **1998**, 435, 61–64.
- [101] J. J. Schmidt, R. G. Stafford, *FEBS Lett.* **2002**, 532, 423–426.
- [102] M. Brewer, C. A. James, D. H. Rich, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4779–4782.
- [103] B. E. Haug, D. H. Rich, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4783–4786.

- [104] C. Sukonpan, T. Oost, M. Goodnough, W. Tepp, E. A. Johnson, D. H. Rich, *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 181–193.
- [105] T. Oost, C. Sukonpan, M. Brewer, M. Goodnough, W. Tepp, E. A. Johnson, D. H. Rich, *Biopolymers* **2003**, *71*, 602–619.
- [106] C. Anne, S. Turcaud, J. Quancard, F. Teffo, H. Meudal, M. C. Fournié-Zaluski, B. P. Roques, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4648–4656.
- [107] L. Martin, F. Cornille, S. Turcaud, H. Meudal, B. P. Roques, M. C. Fournié-Zaluski, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 515–525.
- [108] L. Martin, F. Cornille, P. Coric, B. P. Roques, M. C. Fournié-Zaluski, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3450–3460.
- [109] M. A. Hanson, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 687–692.
- [110] S. Swaminathan, S. Eswaramoorthy, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 693–699.
- [111] A. Blommaert, S. Turcaud, C. Anne, B. P. Roques, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3055–3062.
- [112] E. R. Evans, J. M. Sutton, A. Gravett, C. C. Shone, *Toxicon* **2005**, *46*, 446–453.
- [113] A. G. Zdanovsky, N. V. Karassina, D. Simpson, M. V. Zdanovskaia, *J. Protein Chem.* **2001**, *20*, 73–80.
- [114] K. P. A. B. Yiadom, S. Muhie, D. C. H. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 1247–1253.
- [115] G. E. Boldt, J. P. Kennedy, M. S. Hixon, L. A. McAllister, J. T. Barbieri, S. Tzipori, K. D. Janda, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 513–521.
- [116] Z. Fu, S. Chen, M. R. Baldwin, G. E. Boldt, A. Crawford, K. D. Janda, J. T. Barbieri, J. J. Kim, *Biochemistry* **2006**, *45*, 8903–8911.
- [117] G. E. Boldt, J. P. Kennedy, K. D. Janda, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1729–1732.
- [118] J. G. Park, P. C. Sill, E. F. Makiyi, A. T. Garcia-Sosa, C. B. Millard, J. J. Schmidt, Y. P. Pang, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 395–408.
- [119] J. C. Burnett, J. J. Schmidt, R. G. Stafford, R. G. Panchal, T. L. Nguyen, A. R. Hermone, J. L. Vennerstrom, C. F. McGrath, D. J. Lane, E. A. Sausville, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, S. Bavari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 84–93.
- [120] N. R. Silvaggi, G. E. Boldt, M. S. Hixon, J. P. Kennedy, S. Tzipori, K. D. Janda, K. N. Allen, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 533–542.
- [121] R. E. Sheridan, S. S. Deshpande, *Toxicon* **1995**, *33*, 539–549.
- [122] L. L. Simpson, J. A. Coffield, N. Bakry, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 720–727.
- [123] F. Cai, C. B. Adrion, J. E. Keller, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 5617–5624.
- [124] F. N. Fu, R. B. Lomneth, S. Cai, B. R. Singh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5267–5278.
- [125] L. Li, B. R. Singh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10581–10586.
- [126] L. M. Eubanks, M. S. Hixon, W. Jin, S. Hong, C. M. Clancy, W. H. Tepp, M. R. Baldwin, C. J. Malizio, M. C. Goodnough, J. T. Barbieri, E. A. Johnson, D. L. Boger, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2602–2607.
- [127] G. E. Boldt, L. M. Eubanks, K. D. Janda, *Chem. Commun.* **2006**, 3063–3065.
- [128] M. A. Hanson, T. K. Oost, C. Sukonpan, D. H. Rich, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11268–11269.
- [129] M. Adler, J. D. Nicholson, B. E. Hackley, Jr., *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 234–238.
- [130] R. R. Roe, Y. P. Pang, *J. Mol. Model.* **1999**, *5*, 134–140.
- [131] J. Tang, J. G. Park, C. B. Millard, J. J. Schmidt, Y. P. Pang, *PLoS One* **2007**, *2*, e761.
- [132] J. C. Burnett, G. Ruthel, C. M. Stegmann, R. G. Panchal, T. L. Nguyen, A. R. Hermone, R. G. Stafford, D. J. Lane, T. A. Kenny, C. F. McGrath, P. Wipf, A. M. Stahl, J. J. Schmidt, R. Gussio, A. T. Brunger, S. Bavari, *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 5004–5014.
- [133] B. Segelke, M. Knapp, S. Kadkhodayan, R. Balhorn, B. Rupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6888–6893.
- [134] J. C. Burnett, D. Opsenica, K. Sriraghavan, R. G. Panchal, G. Ruthel, A. R. Hermone, T. L. Nguyen, T. A. Kenny, D. J. Lane, C. F. McGrath, J. J. Schmidt, J. L. Vennerstrom, R. Gussio, B. A. Solaja, S. Bavari, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2127–2136.
- [135] B. Rudy, *Neuroscience* **1988**, *25*, 729–749.
- [136] H. Lundh, S. G. Cull-Candy, S. Leander, S. Thesleff, *Brain Res.* **1976**, *110*, 194–198.
- [137] H. Lundh, S. Leander, S. Thesleff, *J. Neurol. Sci.* **1977**, *32*, 29–43.
- [138] P. Metzeau, M. Desban, *Toxicon* **1982**, *20*, 649–654.
- [139] M. Adler, J. Scovill, G. Parker, F. J. Lebeda, J. Piotrowski, S. S. Deshpande, *Toxicon* **1995**, *33*, 527–537.
- [140] M. Adler, D. A. Macdonald, L. C. Sellin, G. W. Parker, *Toxicon* **1996**, *34*, 237–249.
- [141] M. Adler, B. Capacio, S. S. Deshpande, *Toxicon* **2000**, *38*, 1381–1388.
- [142] E. Satoh, T. Ishii, Y. Shimizu, S. Sawamura, M. Nishimura, *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 797–798.
- [143] E. Satoh, T. Ishii, Y. Shimizu, S. Sawamura, M. Nishimura, *Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *90*, 199–202.
- [144] M. Nakatani, *Heterocycles* **1999**, *50*, 595–609.
- [145] Y. S. Xie, P. G. Fields, M. B. Isman, W. K. Chen, X. Zhang, *J. Stored Prod. Res.* **1995**, *31*, 259–265.
- [146] J. B. Zhou, Y. Minami, F. Yagi, K. Tadera, M. Nakatani, *Heterocycles* **1997**, *45*, 1781–1786.
- [147] Y. L. Shi, M. F. Li, *Prog. Neurobiol.* **2007**, *82*, 1–10.
- [148] Y. L. Shih, N. S. Wei, Y. Q. Yang, Z. X. Wang, *Acta Physiol. Sin.* **1980**, *32*, 293–297.
- [149] Y. Shih, K. Hsu, *Jpn. J. Physiol.* **1983**, *33*, 677–680.
- [150] M. F. Li, Y. Wu, Z. F. Wang, Y. L. Shi, *Neurosci. Res.* **2004**, *49*, 197–203.
- [151] Z. F. Wang, Y. L. Shi, *Neuroscience* **2001**, *104*, 41–47.
- [152] Z. F. Wang, Y. L. Shi, *Neurosci. Res.* **2001**, *40*, 211–215.
- [153] M. Z. Tang, Z. F. Wang, Y. L. Shi, *Neurosci. Res.* **2003**, *45*, 225–231.
- [154] E. A. Johnson, *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 551–575.
- [155] L. A. McAllister, M. S. Hixon, J. P. Kennedy, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4176–4177.
- [156] P. Viparelli, F. Alfani, M. Cantarella, *Biochem. J.* **1999**, *344*, 765–773.
- [157] M. S. Celej, M. G. D'Andrea, P. T. Campana, G. D. Fidelio, M. L. Bianconi, *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1059–1066.
- [158] C. Blanes-Mira, J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernández-Ballester, B. Ponsati, L. Gutierrez, E. Pérez-Payá, A. Ferrer-Montiel, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2002**, *24*, 303–310.
- [159] M. A. Ruiz, B. Clares, M. E. Morales, S. Cazalla, V. Gallardo, *J. Cosmet. Sci.* **2007**, *58*, 157–171.